

THESIS

Cologne

1967

Pleiotrope Mutationen
im Gen-Komplex
der Pyruvatdehydrogenase
von *Escherichia coli*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Gunther Dennert
aus Hettstedt

Köln 1967

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Pleiotrope Mutationen
im Gen-Komplex
der Pyruvatdehydrogenase
von *Escherichia coli*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Gunther Dennert
aus Hettstedt

Köln 1967

Berichterstatter: Prof. Dr. P. Starlinger

Prof. Dr. A. Egelhaaf

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli 1967

Einleitung	1
1. Die Geburt Christi	2
2. Die Kindheit Christi	3
3. Die Jugend Christi	4
4. Die Tötung Christi	5
5. Die Auferstehung Christi	6
6. Die Himmelfahrt Christi	7
7. Die Pfingsten	8
8. Die Erntezeit	9
9. Die Weinlese	10
10. Die Erntezeit	11
11. Die Weinlese	12
12. Die Erntezeit	13
13. Die Weinlese	14
14. Die Erntezeit	15
15. Die Weinlese	16
16. Die Erntezeit	17
17. Die Weinlese	18
18. Die Erntezeit	19
19. Die Weinlese	20
20. Die Erntezeit	21
21. Die Weinlese	22
22. Die Erntezeit	23
23. Die Weinlese	24
24. Die Erntezeit	25
25. Die Weinlese	26
26. Die Erntezeit	27
27. Die Weinlese	28
28. Die Erntezeit	29
29. Die Weinlese	30
30. Die Erntezeit	31
31. Die Weinlese	32
32. Die Erntezeit	33
33. Die Weinlese	34
34. Die Erntezeit	35
35. Die Weinlese	36
36. Die Erntezeit	37
37. Die Weinlese	38
38. Die Erntezeit	39
39. Die Weinlese	40
40. Die Erntezeit	41
41. Die Weinlese	42
42. Die Erntezeit	43
43. Die Weinlese	44
44. Die Erntezeit	45
45. Die Weinlese	46
46. Die Erntezeit	47
47. Die Weinlese	48
48. Die Erntezeit	49
49. Die Weinlese	50
50. Die Erntezeit	51
51. Die Weinlese	52
52. Die Erntezeit	53
53. Die Weinlese	54
54. Die Erntezeit	55
55. Die Weinlese	56
56. Die Erntezeit	57
57. Die Weinlese	58
58. Die Erntezeit	59
59. Die Weinlese	60
60. Die Erntezeit	61
61. Die Weinlese	62
62. Die Erntezeit	63
63. Die Weinlese	64
64. Die Erntezeit	65
65. Die Weinlese	66
66. Die Erntezeit	67
67. Die Weinlese	68
68. Die Erntezeit	69
69. Die Weinlese	70
70. Die Erntezeit	71
71. Die Weinlese	72
72. Die Erntezeit	73
73. Die Weinlese	74
74. Die Erntezeit	75
75. Die Weinlese	76
76. Die Erntezeit	77
77. Die Weinlese	78
78. Die Erntezeit	79
79. Die Weinlese	80
80. Die Erntezeit	81
81. Die Weinlese	82
82. Die Erntezeit	83
83. Die Weinlese	84
84. Die Erntezeit	85
85. Die Weinlese	86
86. Die Erntezeit	87
87. Die Weinlese	88
88. Die Erntezeit	89
89. Die Weinlese	90
90. Die Erntezeit	91
91. Die Weinlese	92
92. Die Erntezeit	93
93. Die Weinlese	94
94. Die Erntezeit	95
95. Die Weinlese	96
96. Die Erntezeit	97
97. Die Weinlese	98
98. Die Erntezeit	99
99. Die Weinlese	100

Gliederung und Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Einleitung</u>	1
<u>Methodischer Teil</u>	4
1.) Bakterien, Phagen und mikrobiologische Methoden	4
2.) Chemische und physikalische Methoden	9
<u>Hauptteil</u>	14
1.) Pleiotrope Mutationen in einem Strukturgen des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes	14
2.) Suppressoren pleiotroper Mutationen	17
a) Isolierung und Identifizierung als am- und oc-Suppressoren	17
b) Wirkung von am-Suppressoren auf die Synthese der Pyruvatdehydrogenase	20
α) Isolierung eines den Suppressor suY tragenden defekten Phagen	20
β) Wirkung von Suppressoren auf verschiedene am-Orte	22
γ) Kinetik des Erscheinens der Suppressorgen-Funktion und Versuch der Bestimmung der Synthesesequenz der Komponenten des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes	24
i) Suppressionskinetik von T4 am-Mutanten	24
ii) Suppressionskinetik der ace-am-Mutanten	24
iii) Synthesesequenz der Enzymkomponenten	25
δ) "Nicht Supprimierbarkeit" von am-Orten durch am-Suppressoren	27

	Seite
c) Eigenschaften und Wirkungsweise der am-Suppressoren	29
α) Charakterisierung als Punktmutationen und Kartierungen	29
β) Eigenschaften von su ⁻ -Reversionen	32
i) Eigenschaften von Ac32 su1D ⁻ 50	33
ii) Eigenschaften von Ac32 su1D ⁻ 14 und Ac32 su1D ⁻ 21	35
γ) Aminosäure-Inkorporation durch den Suppressor suY	36
δ) Aminosäure-Inkorporation durch den Suppressor su1D	37
<u>Diskussion</u>	38
Pleiotrope Mutationen im Strukturgen der Decarboxylase-Komponente des Pyruvatdehydrogenase Komplexes	38
Wirkung von am-Suppressoren auf die Synthese der Pyruvatdehydrogenase	40
Eigenschaften der am-Suppressoren	43
Wirkungsweise der am-Suppressoren	44
<u>Zusammenfassung</u>	47
Legenden zu den Abbildungen	49
Verzeichnis der Abkürzungen	54
<u>Literaturverzeichnis</u>	56

Einleitung

Als ein Hauptmerkmal der lebenden Zelle läßt sich neben der Fähigkeit zur Selbstreproduktion der Stoff- und Energiewechsel anführen, der erst durch sein abgestimmtes Funktionieren die verschiedenen Lebensvorgänge ermöglicht. Zu diesem Funktionieren ist, wie es auch aus thermodynamischen Erwägungen unerläßlich erscheint, ein ständiger "turnover" der Zellbestandteile notwendig, d.h. die Zelle befindet sich in einem dynamischen Gleichgewicht. Die hieraus folgende Notwendigkeit von Regulationsmechanismen liegt auf der Hand. Eine Möglichkeit, den Stoff- und Energiewechsel zu regulieren besteht darin, die Synthese der Enzyme und damit die der Intermediär- oder Endprodukte des Stoffwechsels zu beeinflussen.

Die Regulation der Enzymsynthese ist seit langem bekannt und in den letzten Jahren ausgiebig studiert worden. Zwei Möglichkeiten sind heute unterscheidbar, die in vielfältigen Variationen auftreten: Die einer positiven Kontrolle, wie sie im Arabinose-Operon beobachtet wurde (Englesberg et al., 1965) und die einer negativen Kontrolle, wie sie von Jacob und Monod (z.B. 1961 und 1965) im Lactose-Operon entdeckt worden ist. Die negative Kontrolle kann in Form eines Induktionsmechanismus oder eines Repressionsmechanismus ausgeübt werden. Für die erste Möglichkeit ist das Lactose-Operon ein Beispiel. Ein Regulator-Gen-Produkt (Repressor) hemmt die Produktion des Enzymes, seine hemmende Wirksamkeit kann durch einen Induktor inaktiviert werden.

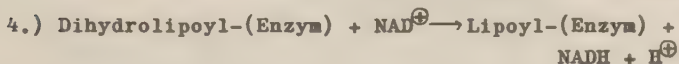
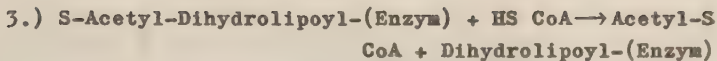
Ein primär reprimiertes System liegt z.B. im Fall des Tryptophan-Operons vor. Das Endprodukt der Synthesekette, Tryptophan (oder ein Derivat dieser Aminosäure), hemmt zusammen mit wenigstens einem Regulatorgen-Produkt die Enzymsynthese, d.h. in diesem Fall aktiviert der Effektor (Tryptophan) das Regulator-Gen-Produkt. In beiden Fällen ist also die kontrollierende Wirkung der Regulator-Gen-Produkte eine negative, die Hemmung der relevanten Enzymsynthese.

Die Daten von Englesberg und Mitarbeitern machen für das Arabinose-Operon das Umgekehrte wahrscheinlich. Die Wirkung eines Regulator-Gen-Produktes ist zur Enzymsynthese erforderlich. Während über den Mechanismus der negativen Kontrolle genauere Vorstellungen existieren (z.B. Willson et al., 1964), ist noch ganz unbekannt, ob die positive Kontrolle im Prinzip den gleichen biochemischen Reaktionen folgt. Auch ist natürlich die Frage, ob sich die Zelle für diese Arten von Regulation immer des gleichen Grundprinzips bedient.

Im Rahmen dieser Frage wurde die Regulierbarkeit der Synthese der Pyruvatdehydrogenase in *E. coli* untersucht.

Es soll daher zunächst kurz einiges über das Enzym und der von ihm katalysierten Reaktionen ausgeführt werden. Wie die Fettsäuresynthetase (Lynen, 1964) und die α -Ketoglutar-säuredehydrogenase (Koike et al., 1963) ist die Pyruvatdehydrogenase ein Multienzymkomplex (Koike et al., 1963). Der Komplex vom Molekulargewicht von $4,8 \times 10^6$ kann in drei Komponenten zerlegt werden: die Decarboxylase, die Liponsäure-reduktase-Transacetylase und die Dihydroliponsäure-Dehydrogenase (Koike et al., 1963). Die drei Komponenten werden durch die Liponsäurereduktase-Transacetylase zusammengehalten und können in vitro zum funktionsfähigen Komplex zusammengesetzt werden. Nach Arbeiten von Reed und Mitarbeitern (1966) enthält der Komplex 12 Moleküle Decarboxylase (M.G.: $1,8 \times 10^5$), 1 Molekül Liponsäurereduktase-Transacetylase (M.G.: $1,7 \times 10^6$) und 6 Moleküle Dihydroliponsäure-Dehydrogenase ($1,12 \times 10^5$). Endgruppenbestimmungen von Reed (pers. Mitt.) sprechen dafür, daß die Decarboxylase aus 2 α - und 2 β -Ketten besteht. Die Liponsäurereduktase-Transacetylase besteht aus 24 oder 48 identischen Ketten (Reed und Cox, 1966), während die Dihydroliponsäure-Dehydrogenase vermutlich aus zwei identischen Ketten zusammengesetzt ist (Massey et al., 1962). Der Abbau des Pyruvats geht höchstwahrscheinlich nach folgendem Reaktionsschema vor sich (Gunsalus, 1954):

- 1.) $\text{Pyruvat} + \text{TPP} - (\text{Enzym}) \rightarrow \text{Hydroxyäthyl-TPP} - (\text{Enzym}) + \text{CO}_2$
- 2.) $\text{Hydroxyäthyl-TPP} - (\text{Enzym}) + \text{Lipoyl} - (\text{Enzym}) \rightarrow \text{S-Acetyl-}$
 $\text{Dihydrolipoyl} - (\text{Enzym}) + \text{TPP} - (\text{Enzym})$



Die Decarboxylase katalysiert Reaktion 1), die Liponsäure-reduktase-Transacetylase Reaktion 2) und 3) und die Dihydroliponsäure-Dehydrogenase Reaktion 4). Alle Zwischenprodukte bleiben Enzym-gebunden.

Die Synthese der Pyruvatdehydrogenase ist regulierbar (Henning et al., 1966). Wachstum der Zellen auf Pyruvat läßt die Enzymproduktion um das 10 - 15 fache derjenigen auf Acetat ansteigen.

Auf dem Chromosom von E.coli liegt der Strukturgenkomplex der Pyruvatdehydrogenase zwischen dem Leucin-locus und dem des T1,5-Receptors. Mutanten, die keine Pyruvatdehydrogenase-Aktivität mehr zeigen, benötigen zum Wachstum Acetat. Unter den bisher etwa 160 isolierten ace^- -Mangelmutanten befindet sich ein großer Teil (10 - 20 %) von pleiotropen Mutanten vom sogenannten O^0 -Typ, die keine der 3 Teilenzyme des Gesamtkomplexes mehr synthetisieren. Das im Gegensatz zu anderen Systemen bemerkenswert häufige Auftreten von sogenannten O^0 -Typ-Mutanten ließ daran denken, daß diese Mutanten solche mit defekter Regulation darstellen. Die Frage nach der Natur und dem Funktionsmechanismus dieser Mutanten war der Ausgangspunkt dieser Arbeit.

Methodischer Teil

1.) Bakterien, Phagen und mikrobiologische Methoden

Medien und Substanzen:

L-Bouillon (Lennox, 1955) oder Penassay Broth (PB) (Difco Antibiotic Medium 3) wurden als Vollmedien benutzt. Für die Arbeiten mit T4-Phagen wurden die üblichen Standard-Techniken angewendet (siehe Bode, 1963). Für das Arbeiten mit ace-Mangelmutanten wurde das Minimalmedium nach Vogel und Bonner (1956) unter Zusatz von 0.5 % Succinat und 0.1 % Acetat verwendet. Für das Arbeiten mit Phosphatase-Mutanten wurde Tris-Glukose-Medium nach Echols et al. (1961) benutzt. Zur Suspension von Phagen und Bakterien wurde entweder Vollmedium oder 0.85 % NaCl-Lösung (Saline) verwendet.

Anti-T4-Serum wurde von R. Freedman durch Dr. R. Hertel erhalten. Alle übrigen Substanzen wurden von den üblichen Bezugsquellen bezogen.

Bakterienstämme:

Hfr C₁: wurde erhalten von Dr. E.A. Adelberg. Er ist nicht permissiv für T4 am-Phagen und ist met⁻. Durch Penicillinselektion wurden die Derivate Hfr C₂ met⁻try⁻, Hfr C₃ met⁻try⁻leu⁻ hergestellt. Nach UV-Mutagenese und nachfolgender Penicillinselektion wurden die ace⁻-Mutanten Ac32, Ac38 erhalten. Die cys⁻-Derivate wurden durch try-gekoppelte Transduktion mit Pi aus einem cys⁻-Stamm gewonnen (Henning et al., 1964 a b c).

YMel λ^+ : wurde von Dr. C. Yanofsky erhalten. Der Stamm wurde von λ mit dem Phagen λ b₂b₅ kuriert (siehe unten). YMel A33 ist eine Tryptophansynthetase-Mutante (C. Yanofsky). Ac7, Ac8 und Ac13 sind nach UV-Mutagenese und nachfolgender Penicillinselektion in diesem Stamm isoliert worden (Henning et al., 1964c). YMel ist permissiv für die T4-Phagen am N52, am N82, schwach permissiv für am B17 und am B272 und nicht permissiv für am BH23 und BH230.

AB312: wurde erhalten von Dr. E.A. Adelberg. Er ist $B1^{-}Sm^{+}$ $lac^{-}thr^{-}leu^{-}$ und permissiv für die T4 am B17, am N52, am N82, nicht permissiv für am B272 und am B272-S1. Ac45 ist eine Pyruvatdehydrogenase-Mutante, die nach UV-Mutagenese isoliert wurde.

CR63: wurde als permissiver Wirt für T4 am-Mutanten verwendet und von Dr. C. Steinberg erhalten.

Hfr H $R_{try}^{-} try^{-} B1^{-}$: ist ein für die Tryptophansynthetase konstitutiver Stamm, der von Dr. C. Yanofsky erhalten wurde. Durch UV-Mutagenese wurden die Derivate Nr. 2 thr^{-} , Nr. 3 leu^{-} sowie die ace^{-} -Mutanten Ac63, Ac67 und Ac130 erhalten (Henning et al., 1966).

W1485: Prototroph λ^{-} wurde von Dr. H. Kneser erhalten und zur Titration von Phagen verwendet. Aus diesem Stamm wurde die Derivate W1485 $T1^{+}$ und W1485 $\phi 80^{+}$ isoliert.

Hfr C H12 $su3^{-}$: ist eine am-Mutation im Gen der alkalischen Phosphatase (Weigert et al., 1965 a b c). Der Stamm wurde von Dr. A. Garen freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

W8 F^{-} : ist ein prototropher K12 Stamm, der von Dr. H. Kneser erhalten wurde. Aus diesem Stamm wurde das Derivat W8 $\lambda^{-} \lambda^{+}$ $\phi 80^{+}$ hergestellt.

W1655 $met^{-} F^{+}$: ist ein K12 Stamm, der ebenfalls von Dr. H. Kneser erhalten wurde. Aus diesem Stamm wurde das Derivat W1655 $\lambda^{-} \lambda^{+} \phi 80^{+}$ hergestellt.

Hfr $H\lambda^{+}$: wurde von Dr. H. Kneser erhalten.

C600: ist ein $T1^{+}K12$ Stamm, erhalten von Dr. H. Kneser.

CA208.1 $\phi 80^{+}$: wurde freundlicherweise von Dr. J. Beckwith zur Verfügung gestellt. Aus diesem Stamm wurde durch UV-Induktion der Phage $\phi 80$ erhalten.

Phagenstämme:

$\phi 80$: Lytische Phagen wurden aus einem UV-induzierten Lysat vom Stamm CA208.1 hergestellt. Dieser $\phi 80$ wurde von Dr. E. Signer aus einem von Dr. Matsushiros Stämmen isoliert.

λ : Der Wildtypphage wurde freundlicherweise von Dr. H. Kneser zur Verfügung gestellt.

$\lambda_{b_2b_5}$: wurde isoliert von Dr. E. Signer und erhalten von Dr. E. Kölsch. Mit diesem Phagen wurde der Stamm YMel λ^+ vom Phagen λ durch Infektion kuriert.

P1 kc: erhalten von Dr. C. Yanofsky, wurde zu Transduktionen verwendet (Lennox, 1955).

T4D: Wildtyp und am-Mutanten am B17, am H36, am N52, am 82, am B272 wurden von Dr. R. Epstein und A. Bolle erhalten. Am B272 S-1 ist eine spontane Revertante von am B272, die sich normal in YMel vermehrt, aber schlecht in Ab312. Sie wurde von Dr. R. Hertel isoliert. Am BH23 und BH230 wachsen auf HfrC sulD^+ , aber beide nicht auf YMel und BH230 nicht auf CR63, sie wurden von Dr. R. Hertel isoliert. Die T4 oc-Mutanten X264, X511, UV375, N21, 360, 375 wurden freundlicherweise von Dr. A. Stretton zur Verfügung gestellt (Brenner u. Beckwith, 1965).

Isolierung des $i^{\lambda}h^{\phi 80}$:

Hybride der Phagen λ und $\phi 80$ (Signer, 1964; Franklin et al., 1965) besitzen entsprechend den Anteilen an λ - und $\phi 80$ -Genom verschiedene Dichten. Es wurde daher ein $i^{\lambda}h^{\phi 80}$ gesucht, der in der Lage war, $\phi 80\text{dtsuY}$ zu helfen, sich aber von ihm im Dichtegradienten trennt. Zu diesem Zweck wurde der Stamm YMel $\lambda^+\phi 80^+$ mit UV induziert und das Lysat nach der von Franklin et al. (1965) beschriebenen Technik auf dem Stamm W8 λ^- $\lambda^{\text{r}}\phi 80^+$ plattiert. Auf diesem Stamm sollten Hybride von der Konstitution $i^{\lambda}h^{\phi 80}$ wachsen. Eine Anzahl "plaques" wurden isoliert und von ihnen lytische Lysate auf W8 λ^- $\lambda^{\text{r}}\phi 80^+$ hergestellt. Mit diesen Lysaten wurde W8 λ^- $\lambda^{\text{r}}\phi 80^+$ lysogenisiert und auf die mit Oberagar plattierten Teststämme W8, C600T1 $^{\text{r}}$ CA208.1 $\phi 80^+$ und Hfr H λ^+ getropft und UV-induziert. Unter etwa 20 Isolaten fanden sich 3, die auf W8 und CA208.1 $\phi 80^+$ wuchsen, nicht aber auf C600T1 $^{\text{r}}$ und Hfr H λ^+ . Die Hybriden produzierten im Gegensatz zu λ und $\phi 80$ große "plaques" und lysogenisierten schlecht. Zur näheren Charakterisierung wurde

	W1485	HfrH λ^+	W1655 $\lambda^r \phi 80^+$
I $i\lambda h \phi 80$	$2,4 \times 10^{10}$	8×10^7	3×10^{10}
III $i\lambda h \phi 80$	$1,6 \times 10^{10}$	$< 10^7$	$2,6 \times 10^{10}$
VIII $i\lambda h \phi 80$	8×10^9	$< 10^7$	1×10^{10}

Tabelle I. Titer der $\phi 80$ - λ -Hybriden-Lysate auf verschiedenen Teststämmen.

	CA208.1	HfrH λ^+	W1485	W1655 $\lambda^r \phi 80^+$
I $i\lambda h \phi 80 \phi 80 \text{dtsuY}$	$5,5 \times 10^9$	3×10^5	$4,5 \times 10^{10}$	$4,6 \times 10^{10}$
VIII $i\lambda h \phi 80 \phi 80 \text{dtsuY}$	7×10^9	3×10^4	7×10^9	8×10^9

Tabelle II. Titer eines HFT-Lysates auf verschiedenen Teststämmen.

die Plattierungswahrscheinlichkeit auf den Stämmen W1485, W1655 $\lambda^r\lambda^-$ ϕ 80 und Hfr H λ^+ gemessen. Wie Tabelle I zeigt, plattieren die Hybriden, wie zu erwarten, nur mit kleiner Wahrscheinlichkeit auf einem λ -lysogenen Wirt. Zur Konstruktion der Heterogenoten $i^{\lambda}h^{\phi 80}$, ϕ 80dtsuY wurden ein ϕ 80, ϕ 80dtsuY HFT und ein $i^{\lambda}h^{\phi 80}$ Lysat im Verhältnis 1:80 gemischt und der Stamm Ac32 try $^-$ mit einer Multiplizität von 2 (für den Anteil des Hybriden) infiziert. Try $^+$, ace $^+$ -Transduktanden wurden isoliert und durch Anfertigung eines induzierten Lysates geprüft, ob sie in der Lage waren, transduzierenden ϕ 80dtsuY zu entlassen. Auch wurden diese Stämme auf den Indikatorstämmen CA208.1, Hfr H λ^+ , W1485 und W1655 λ^r ϕ 80 $^+$ titriert. Tabelle II zeigt, daß die Hybriden I $i^{\lambda}h^{\phi 80}$ und VIII $i^{\lambda}h^{\phi 80}$ ϕ 80dtsuY komplementieren können, während z.B. die Infektion mit III $i^{\lambda}h^{\phi 80}$ keine Heterogenoten ergab, mit anderen Worten, dieser Phage war nicht in der Lage, ϕ 80dtsuY zu helfen.

Lysogenie-Teste:

Zur Prüfung, ob ein Stamm ϕ 80 lysogen ist, wurde er hochgezogen, auf mit Oberagar plattierte Teststämmen getropft und zur Induktion des ϕ 80 mit UV bestrahlt. Das Auftreten von Lysehöfen auf den entsprechenden Stämmen charakterisiert den induzierten Phagen: ϕ 80 gibt Lysehöfe auf den Teststämmen: Hfr H λ^+ , W1485 und keine Lysehöfe auf W1485 ϕ 80 $^+$ und W1485 T1 r .

Analyse von Heterogenoten:

Segregation:

Kulturen für enzymatische Bestimmungen wurden aerob in Minimalmedium unter Zusatz von 0.4 % Glukose hochgezogen. Dieses Medium enthielt kein Tryptophan und Acetat und war daher selektiv für die von ϕ 80dtsuY inkorporierten Merkmale. Zellen dieser Kulturen wurden auf Medium mit L-Tryptophan (50 mg/ml) und Acetat plattiert und durch Replikaplattieren auf Medium ohne L-Tryptophan und Acetat auf Vor-

handensein des try⁺ und ace⁺ Charakters untersucht.

Rekombinationsteste:

Ace⁺ try⁺ Kolonien aus dem Segregationstest wurden auf eine Succinatplatte replikaplattiert, die mit ca. 10⁹ Zellen YMel A33 bestrichen war. Nach UV Induktion des ϕ 80dtsuY wurde die Platte 3 Tage inkubiert. Wachstum des YMel A33 zeigte das Vorhandensein von ϕ 80 ϕ 80dtsuY Heterogenoten. Kolonien, die kein HFT-Lysat produzierten, wurden als Rekombinanten klassifiziert.

Konjugation von Bakterienstämmen:

Donor und Recipient wurden bei 37°C in Vollmedium bis auf 5 x 10⁸ Zellen/ml hochgezogen, zentrifugiert und nach Resuspendieren im gleichen Medium zu gleichen Teilen gemischt. Nach 30 Min. (für frühe Merkmale) wurde abzentrifugiert und ausplatziert. Zur Anfertigung von Phänocopien wurden die Stämme bei 27°C in die stationäre Phase wachengelassen (Bonhoeffer, 1966) und dann wie üblich zur Konjugation inkubiert.

Lysate von ϕ 80:

Die Kulturen wurden in PB bis auf 5 x 10⁸ Zellen/ml gezüchtet, abzentrifugiert, in Saline aufgenommen und in Petrischalen zu je 5 ml mit UV induziert, dann wurde PB, die 10 fach konzentriert war, bis zur normalen Endkonzentration zugegeben und 2 - 3 Std. belüftet, chloroformiert und zentrifugiert. Titriert wurde routinemäßig auf dem Stamm W1485. Zur Erstellung von HFT-Lysaten von stark segregierenden Heterogenoten wurde in Minimalmedium ohne Acetat und try bis auf 2 x 10⁸ Zellen/ml weiter wachengelassen, abzentrifugiert und wie oben behandelt.

Transduktion mit ϕ 80:

Die zu transduzierenden Stämme wurden in PB hochgezogen und durch Zentrifugieren 1:10 konzentriert. Nach Zusatz des durch Belüftung bei 37°C von Chloroform befreiten Lysates (Multiplizität 3 - 5) wurde 20 Min. bei 37°C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren und Waschen mit Saline wurden die entsprechenden Verdünnungen auf selektiven Medien ausgespatelt.

2.) Chemische und physikalische Methoden:

Reagentien:

Caesiumchlorid: wurde p.A. von der Firma Merck bezogen.

Trypsin: wurde von der Worthington Biochemical Corporation als zweifach kristallisierte salzfreie Präparation bezogen. Zur Inaktivierung von Chymotrypsin wurde 17 Std. in 1/16 M HCl bei 37°C inkubiert (Wittmann, 1964).

Jodessigsäure: wurde von der Firma Fluka als "reine" Präparation bezogen und aus Äther umkristallisiert und bei -20°C aufgehoben.

1-¹⁴C-Pyruvat: wurde von der New England Nuclear Corporation bezogen. Es hatte eine spezifische Aktivität von 3,5 µC pro µMol.

Alle anderen verwendeten Reagentien waren kommerzielle Präparate, sie wurden ohne weitere Vorbehandlung benutzt.

Proteinbestimmungen: wurden nach der modifizierten Biuret-Methode von Beisenherz et al. (1953) ausgeführt. Gereinigte Phosphatase wurde durch Messung der Extinktion bei 278 mµ gemessen und der von Malamy und Horecker (1964) bestimmte molare Extinktionskoeffizient von 0.72 zur Berechnung benutzt.

Enzymisolierung: Aufzucht und Protoplastierung der Zellen zur Phosphatase-Reinigung wurden nach der Vorschrift von Malamy und Horecker (1964) ausgeführt.

Die Pyruvatdehydrogenase und deren Komponenten wurden wie von Koike et al. (1960) beschrieben, isoliert.

Tryptische Verdauung: Das Protein wurde in 0.01 M Ammoniumcarbonat bei einer Konzentration von 5 mg/ml gelöst, 3% (Gewichtsprozent) Trypsin zugegeben und 3 Std. bei 37°C abgebaut.

Anfertigung der "Fingerprints": Das zweidimensionale Verfahren der Elektrophorese und Chromatografie wurde wie bei Weigert et al. (1965 b c) beschrieben, durchgeführt.

Reduktion und Carboxymethylierung der alkalischen Phosphatase:

Es wurde die Modifikation B wie von Rothman und Byrne (1963) beschrieben, angewendet.

Aminosäureanalyse der Peptide: Peptid L1 und L2 wurden durch Anfärben einer Hälfte des "Fingerprints" und Verwendung einer Schablone in der Lage bestimmt. Die entsprechende Region wurde ausgeschnitten und der Methode von Weigert et al. (1965 b c) folgend mit pH 4,7-Elektrophoresepuffer eluiert. Reelektrophorese bei pH 1,9 (Weigert et al., 1965 b c) trennt die beiden Peptide, die durch Anfärben von Leitstreifen lokalisiert wurden. Die Peptide wurden mit 6 M HCl eluiert, unter Vacuum eingeschmolzen und 16 Std. bei 105°C hydrolysiert. Die Aminosäureanalysen wurden in einem Beckman Unichrom Aminosäureanalysator ausgeführt, der mit Mikrozellen ausgerüstet war, wodurch noch 0.01 µMol Aminosäuren (Außer Prolin) quantitativ bestimmt werden konnten.

Tryptophan wurde durch Färbung mit Ehrlichs Reagenz quantitativ bestimmt. Zur Erstellung einer Analyse wurden die Peptide von 10 - 12 Fingerprints gesammelt.

Enzymteste:

a) Alkalische Phosphatase: wurde nach Vorschrift von Malamy und Horecker (1964) getestet. Eine Einheit Enzym ist definiert als die Menge, die 1 µMol p-Nitrophenylphosphat in 1 Std. bei 30°C freisetzt.

b) Pyruvatdehydrogenase: Für den Pyruvatdehydrogenase-Test wurden die Zellen nach Zentrifugation einmal mit 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7 gewaschen und bei einer Konzentration von 0.5 g/ml 2 min. mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier), dann 20 min. bei 15.000 Upm zentrifugiert und der so gewonnene Überstand zum Test verwendet.

Im Normalfall wurde der Dismutationstest nach Korkes et al. (1951) wie von Reed et al. (1958) beschrieben, verwendet. In diesem Test wird das entstehende NADH durch Reduzierung von Pyruvat zu Laktat wieder oxidiert, d.h. pro Molekül oxidiertem Pyruvat entsteht ein Molekül Laktat. Das ent-

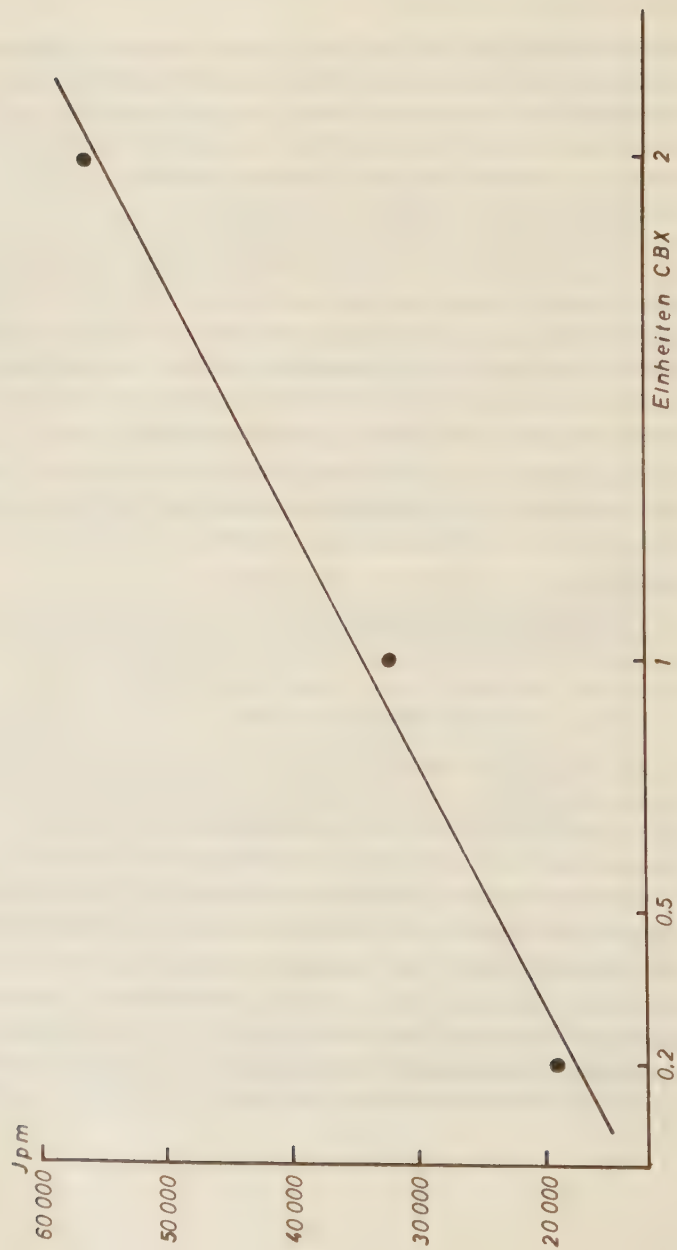


Abb. I

stehende Acetyl-S CoA wird durch Phosphotransacetylase in CoA SH und Acetylphosphat und das letztere in die Acethydroxamsäure überführt. Diese kann in einfacher Weise als Fe^{3+} -Komplex photometrisch gemessen werden. Die spezifische Aktivität ist definiert als μMole Acetylphosphat, gebildet in 1 Std. bei 30°C von 1 mg Protein.

Für einige Versuche wurde ein von Dr. Hansen (1966) ausgearbeiteter radioaktiver Test verwendet. Er wurde in Warburggefäßen durchgeführt. Das Testgemisch entspricht genau dem des Dismutationstestes (Korkes et al., 1951), nur wurde als Substrat $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat verwendet. Dem Gesamttestvolumen von 0.4 ml wurde 1 mg Protein des zu testenden Rohextraktes zugesetzt. Nach 15 min. Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion durch Zukippen von 0.025 ml 5 M H_2SO_4 beendet und das dabei ausgetriebene $^{14}\text{CO}_2$ in 0.2 ml Hyamin aufgefangen. Das Hyamin wurde in Scintillatorflüssigkeit pipettiert und die Proben im Packard Scintillationsspektrometer gemessen. Dieser Test sollte auf Wiederfindung und Empfindlichkeit geprüft werden. Zu diesem Zweck wurden 1 mg O^0 -Extrakt (Ac32) 5 E Restkomplex zugesetzt und dann steigende Mengen von Decarboxylase zugegeben. Abb.I zeigt, daß noch weniger als 0.2 E Decarboxylase in der Gesamtreaktion wiedergefunden werden und daß die hohe Fremdproteinkonzentration die geforderte Linearität nicht stört. Mit dem Acetylphosphattest werden noch 0.4 E wiedergefunden, sodaß der radioaktive Test um einen Faktor > 2 empfindlicher ist.

Aus der Kurve Abb.I ergibt sich:

1 E Decarboxylase	= 34.000 Ipm
Leerwert der 5 E Restkomplex + 1 mg Ac32 Extrakt	= 6.900 Ipm
1 E Decarboxylase setzt in 15 min.	27.100 Ipm/min. $\approx$
	0,235 μMol $^{14}\text{CO}_2$ frei,

d.h. 0.95 μMol CO_2 pro Stunde bei 30°C werden wiedergefunden, also 0,95 E.

Aus Abb.I errechnet sich zugleich die Empfindlichkeit des Testes:

1 Mol Gesamtkomplex $\approx 4 \times 10^6$ g
oder 6×10^{23} Moleküle $\approx 4 \times 10^9$ mg

Die spezifische Aktivität des isolierten Enzymes beträgt etwa 2000 E/mg, daher:

$1,5 \times 10^{14}$ Moleküle = 1 mg = 2000 E
 1×10^{10} Moleküle = 0,133 E

Bei der verwendeten Extraktionsmethode mit Ultraschall entsprechen 1 mg Protein etwa 1×10^{10} Zellen. Da 0,133 E noch wiedergefunden werden, ist also noch ein Molekül Pyruvatdehydrogenase pro Zelle nachweisbar.

Die spezifische Aktivität der Decarboxylase-Komponente wurde stets durch Zusatz von Restkomplex als Gesamtaktivität gemessen und in analoger Weise die spezifische Aktivität des Restkomplexes durch Zusatz von Decarboxylase.

Dichtegradientenzentrifugationen: Die durch niedertouriges Zentrifugieren (10 000 Upm) vorgereinigten Lysate wurden 6 Std. bei 50 000 g zentrifugiert und der Niederschlag in Saline resuspendiert. Für einen Gradienten im SW 39 (der Spinco präparativen Ultrazentrifuge von Beckman) wurden in der Regel 10^{10} bis 10^{11} Phagen (lytischer Titer) benutzt. Die Dichten der Gradienten wurden pyknometrisch auf $\rho = 1,5$ vor dem Lauf eingestellt, sodaß die Phagenbanden etwa in der Mitte des Gradienten erschienen. Die Dichten von VIII $i^{\lambda}h^{\phi 80}$ und $\phi 80$ dtuY betragen nach einer nicht sehr genauen Bestimmung $\rho = 1,509$ für den Hybriden und $\rho = 1,515$ für den transduzierenden Phagen. Die Gradienten wurden 24 Std. bei 22 000 Upm im SW 39 zentrifugiert.

Nach dem Austropfen wurde der lytische Titer (P.T.) der Einzelfraktionen auf W1485 bestimmt. Zur Bestimmung des Transduktionstiters wurden je zwei Fraktionen (d.h. 6 Tropfen) vereinigt, mit Chloroform sterilisiert und je 1×10^{10} Helfer- $\phi 80$ zugegeben. Mit diesem Lysat wurden 1×10^9 Zellen des Stammes Ac32 try⁻ mit einer Multiplizität von 2 infiziert. Plattieren geeigneter Verdünnungen auf Minimalmedium mit try und Acetat und ohne try und Acetat ergibt die Anzahl

der Überlebenden und Transduktanden. Aus dem Verhältnis Transduktanden pro Überlebende ergibt sich die Transduktionswahrscheinlichkeit (T.W.) der Fraktion.

H a u p t t e i l

1.) Pleiotrope Mutationen in einem Strukturgen des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes.

Nach Selektion für Acetat-Auxotrophie fanden sich folgende Klassen von Mutanten (Henning et al., 1964 a):

- 1) Mutanten des Strukturgens der Decarboxylase;
- 2) Mutanten des Strukturgens der Liponsäure-Reduktase Transacetylase;
- 3) Mutanten vom sogenannten O^0 -Typ*, d.h., in Extrakten solcher Mutanten ließ sich keine der Pyruvatdehydrogenase-Komponenten enzymatisch oder immunologisch nachweisen.

Kartierungen durch Transduktion mit dem Phagen P1kc (Yanofsky u. Lennox, 1959) zeigten, daß die Mutationen vom O^0 -Typ zur Linken aller anderen Mutationsorte liegen (Abb.1), d.h., es sind zur Linken der beiden O^0 -Typ Mutationen Ac8 und Ac45 bisher keine Mutationsorte gefunden worden, die dem Strukturgen der Decarboxylase zuzuordnen wären. Es erhob sich daher die Frage nach der Funktion dieses genetischen Bereichs. Es hätte sich z.B. um Mutationsorte handeln können, die in einem hypothetischen Operator oder Regulatorgen liegen. Die Demonstration der Lage dieser Orte im Operator war kaum anzugehen, da die Isolierung von O^C -Mutanten bisher nicht gelang und damit die Möglichkeit einer Kartierung von O^C - und O^0 -Typ-Mutanten entfiel. Auch gab es bereits Hinweise dafür, daß die Mutation Ac8 im Strukturgen der Decarboxylase liegt, da partielle Revertanten von Ac8 (z.B. Ac8 Pr8) eine defekte Decarboxylase produzieren (Henning et al., 1964 c). Zwar war gezeigt worden, daß aus Ac8 Pr8 der Ort Ac8 nur mit Häufig-

* Diese Bezeichnung, die eigentlich falsch ist (s. Beckwith, 1964), wurde dennoch der "extremen Polarisation" vorgezogen, um die Art des Funktionsverlustes, den solche Orte verursachen, nicht zu praejudizieren.

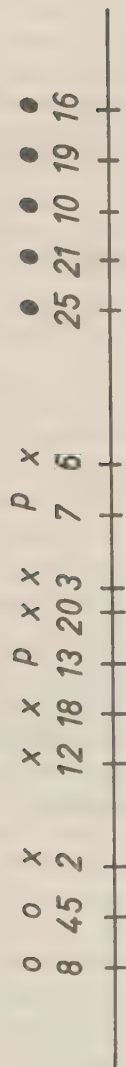


Abb. 1

Stamm	Temperatur (°C) beim Wachstum	Spezifische Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenasen	
		ohne Zusatz	nach Zusatz von Decarboxylase
Wildtyp	30	17	18
	42	20	22
Ac45 PRA	30	20	21
	42	2	19

Tabelle 1. Spezifische Pyruvatdehydrogenase-Aktivitäten
nach Wachstum bei verschiedenen Temperaturen

Alle Stämme waren in flüssigem Minimal-Medium mit 0,4 % Glukose und 0,1 % Na-Acetat aerob zu einer Zellkonzentration von etwa 2×10^9 /ml gewachsen. Zusatz Pyruvatdehydrogenase-spezifischer Decarboxylase (gewonnen nach KOIKE, REED und CARROLL, 1963) erfolgte bis zur Sättigung des vorhandenen Teilkomplexes.

keiten herauskreuzbar wäre, die unter 0.005 % Rekombination lägen (Hirsch-Kauffmann, 1966), aber es waren Deletionen, wie sie als Revertanten von 0° -Typ-Mutationen im Histidin- und Lactose-Operon auftreten (Ames et al., 1963; Beckwith, 1964), nicht völlig ausgeschlossen. Die schon häufig beschriebene Tatsache, daß bei Proteinen durch Aminosäure-Substitution erhöhte Temperaturempfindlichkeit hervorgerufen werden kann (z.B.: Maling und Yanofsky, 1961), legte es nahe, nach Temperatur-empfindlichen Reversionen von Ac8 und Ac45 zu suchen. Die Mutante Ac45 bot sich hierfür besonders an, da eine Temperatur-empfindliche Revertante nicht nur das Temperatur-labile Enzym demonstrieren lassen würde, sondern auch bei Kreuzung mit Ac8 bei hoher Temperatur durch Selektion für Wildtyp-Rekombinanten Deletionen ausschließen lassen würde.

Zu diesem Zweck wurde Ac45 auf Acetat-freiem Minimalmedium ausgespatelt (2×10^9 Zellen pro Platte) und drei Tage bei 42°C inkubiert. Die Revertanten (um 10 pro Platte) wurden markiert und die Platten eine Woche bei Raumtemperatur nachinkubiert. Es fand sich eine Temperatur-empfindliche Revertante, Ac45 P_{RA}, die bei 27°C ohne Acetat wuchs, bei 42°C aber Acetat-bedürftig wurde. Mit P1-Transduktion konnte Ac45 P_{RA} leu-gekoppelt (20 % Kopplung) in den Stamm Hfr C₃ gebracht werden, womit die Wirkung eines weiter entfernt gelegenen Suppressors ausgeschlossen war.

Die Temperatur-Empfindlichkeit von Ac45 P_{RA} beruht auf einer Temperatur-labilen Decarboxylase-Komponente. Tabelle 1 zeigt, daß nach Wachstum des Stammes bei 42°C die spezifische Aktivität des Gesamtkomplexes nurmehr 1/10 derjenigen war, die nach Wachstum bei 30°C gemessen wurde. Nach Zusatz der Decarboxylase stieg die spezifische Aktivität des Gesamtkomplexes im ersteren Fall auf den normalen Wert an, d.h., daß bei 42°C entweder nur wenig Decarboxylase produziert wurde, oder daß sie Temperatur-labil ist. Abb.2a und 2b zeigen, daß die letztere Möglichkeit zutrifft: Nach Wachstum bei 30°C produziert Ac45 P_{RA} einen Pyruvatdehydrogenase-Komplex, dessen Decarboxylase-Komponente eine gegenüber dem

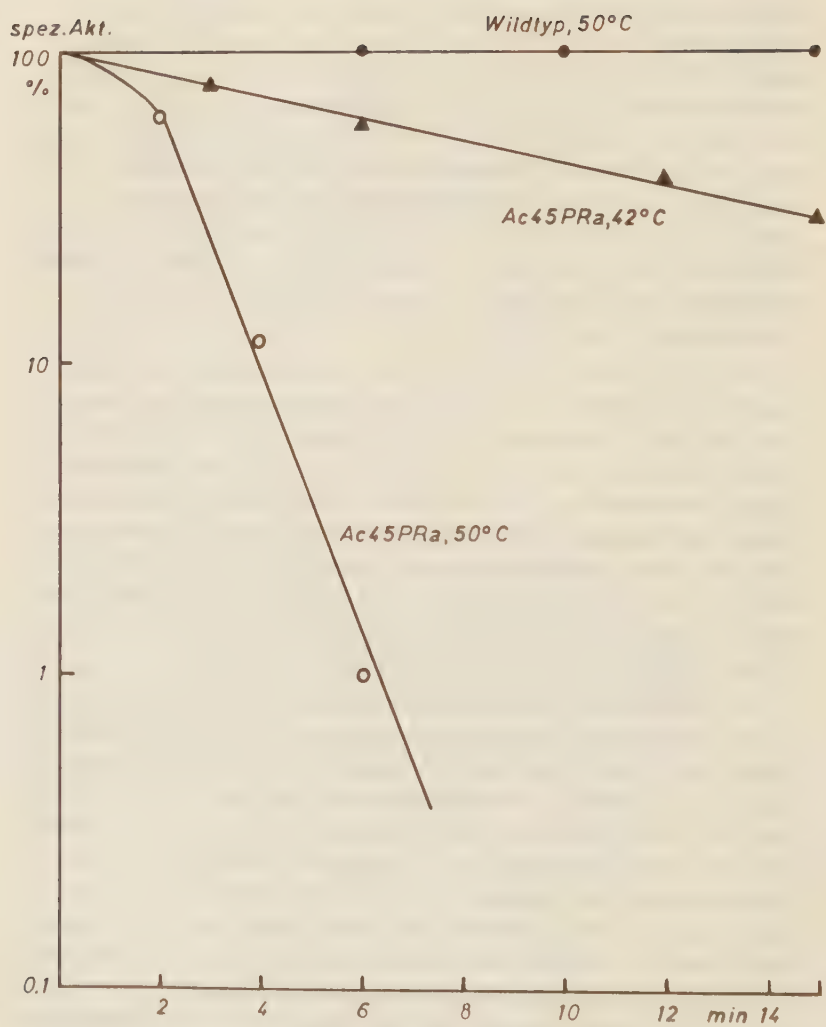


Abb. 2a

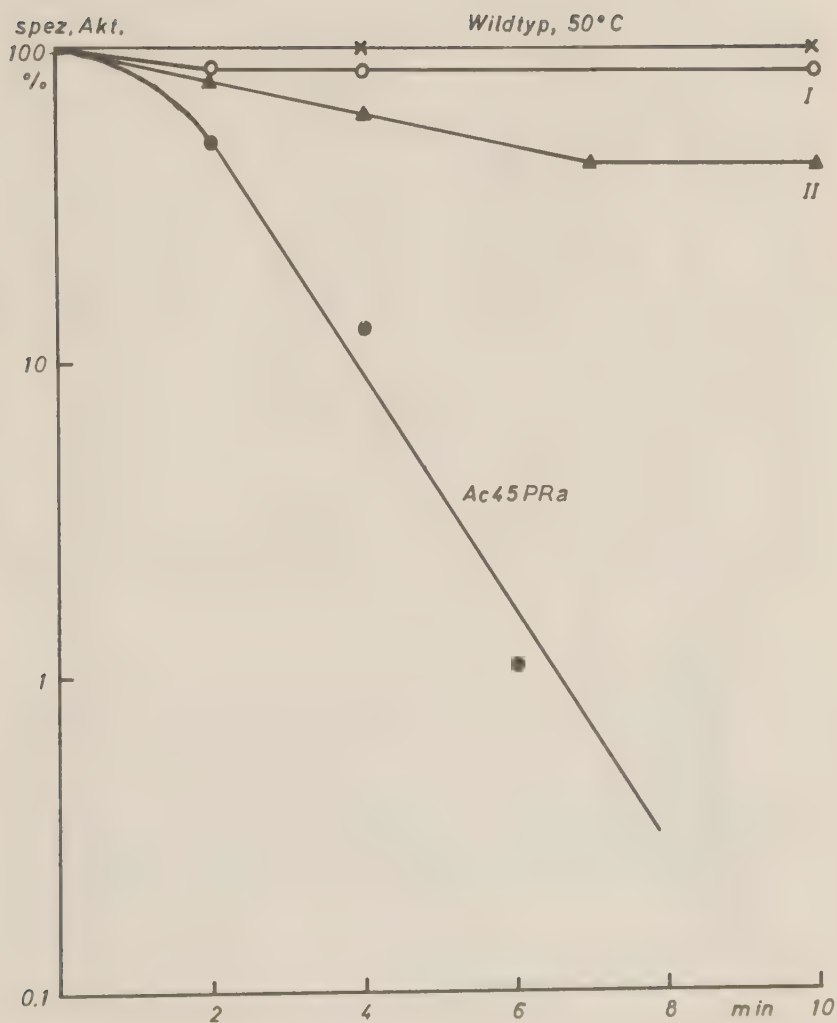


Abb. 2b

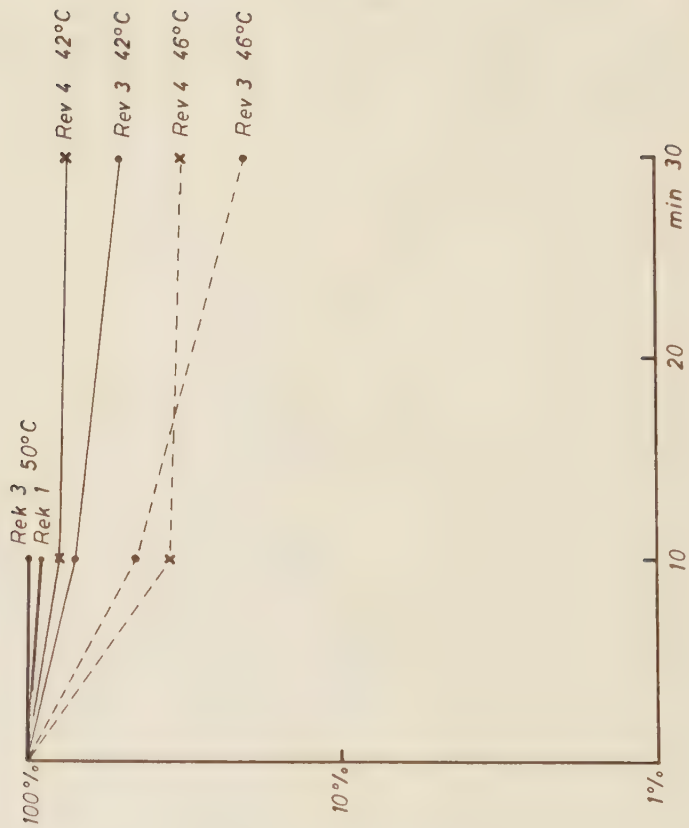


Abb. 3

Donor (leu ⁺)	Recipient (leu ⁻)	SM	NSM	NSM ⁺ /SM ⁺	Bevorzugte Anordnung
Ac8	Ac45	leu ⁺ ace ⁺	ace leu	0/2273 0/326	leu-Ac8-Ac45
Ac45	Ac8	leu ⁺ ace ⁺	ace leu	3/1010 20/200	
Ac8	Ac45P _{Ra}	leu ⁺ ace ⁺	ace leu	0/2029 0/670	leu-Ac8-Ac45P _{Ra}
Ac45P _{Ra}	Ac8	leu ⁺ ace ⁺	ace leu	3/727 12/213	
		ace ⁺ leu	leu	52/710	
		ace ⁺ leu	leu	42/550	
		ace ⁺ (27°C)	leu (27°C)	502/1177	
			ace (40°C)	25/1177	
		ace ⁺ (40°C)	leu (40°C)	12/25	

Tabelle 2. Rekombinations-Analyse zur Anordnung der Orte
leu, Ac8, Ac45, Ac45P_{Ra}

SM: selektives Merkmal; NSM: nichtselektives Merkmal;
NSM⁺/SM⁺: Anteil der NSM⁺-Kolonien an allen SM⁺-Kolonien;
leu: Leucin; ace: Acetat. - Das benutzte leu-Merkmal kann
mit dem Acetat-Locus zu etwa 30% gekoppelt transduziert
werden.

Wildtyp stark erhöhte Temperatur-Empfindlichkeit aufweist.

Temperatur-Stabile Revertanten von Ac45 P_{RA} konnten durch Selektion für Wachstum bei 42°C ohne Acetat isoliert werden. Abb.3 zeigt, daß die Pyruvatdehydrogenase von Rev.3 und Rev.4 zwar wesentlich stabiler als die des Ausgangsstammes ist (vgl. Abb.2a), jedoch bei weitem nicht die Stabilität des Wildtyps aufweist (z.B. Rek.1 und Rek.3).

Das Acetatbedürfnis von Ac45 P_{RA} beruht also auf der Temperatur-labilen Decarboxylase-Komponente. Um nachzuweisen, daß es sich bei der Revertante P_{RA} wirklich um eine Reversion am gleichen Ort, also am Ort Ac45 und nicht etwa um eine Deletion oder eine in der Nähe liegende Suppressor-Gen-Mutation handelt, wurden Ac8 und Ac45 P_{RA} durch P1-Transduktion gekreuzt und der Selektion für Wachstum bei 42°C unterworfen.

Tabelle 2 faßt die Ergebnisse verschiedener Kreuzungen zusammen. Rekombinanten mit Wildtypcharakter traten nach Transduktion in allen möglichen Kombinationen auf. Die unerwartet niedrige Anzahl von leu⁺-Rekombinanten bei den Kreuzungen Ac45 in Ac8 oder Ac45 P_{RA} in Ac8 ist nicht ganz verständlich. Sie sollte bei dem kleinen Abstand zwischen Ac8 und Ac45 (bzw. Ac45 P_{RA}) von etwa 0.3 % Rekombination einerseits und dem großen Abstand von leu-ace von nur 30 % Cotransduktion andererseits bei etwa 30 % liegen (Tab. 2). Entscheidend ist aber, wie schon die erwähnten Temperatur-stabilen Reversionen zeigen, daß Ac45 P_{RA} keine Deletion sein kann; besser, daß eine solche kleiner sein muß als der Abstand zwischen Ac8 und Ac45. Außerdem schließen die Zahlen leu-gekoppelte Reversionen am zweiten Ort und Suppressoren dieser Lokalisation aus. Schließlich wurden zwei Wildtyp-Rekombinanten isoliert und auf ihre Temperatur-Stabilität bei 50°C geprüft. Abb.3 zeigt, daß im Gegensatz zu den Revertanten Rev.3 und Rev.4 die Pyruvatdehydrogenase der beiden Rekombinanten Rek.1 und Rek.3 über einen Zeitraum von 10 min. bei 50°C stabil ist, d.h., die Decarboxylase-Komponenten Wildtypeigenschaften aufweisen.

Die Daten lassen also keinen Zweifel daran, daß der Mutationsort Ac45, der die Synthese sowohl der Decarboxylase- als auch der Liponsäurereduktase-Transacetylase-Komponente blockiert, im Strukturgelen der ersteren Komponente des Enzymkomplexes liegt. Es war folglich ausgeschlossen, daß ein Regulationsmechanismus betroffen ist, der unabhängig von der Struktur der Decarboxylase operiert. Die Frage nach dem Mechanismus der pleiotropen Wirkung dieser Orte wurde damit zur Frage nach der Art der mutierten Codonen.

2.) Suppressoren pleiotroper Mutationen

a) Isolierung und Identifizierung als am- und oc-Suppressoren.

Die Frage nach der Art der mutierten Codonen mit pleiotroper Wirkung hätte sich auf verschiedenen Wegen angehen lassen. Da jedoch schon länger bekannt war, daß Ac8 suppressierbar ist (Henning et al., 1964 o), bot sich als Methode der Wahl an, Suppressoren-Mutanten solcher pleiotroper Mutanten zu isolieren (Beckwith, 1964 a). Die Wirkung dieser Suppressoren könnte dann gegen andere bereits bekannte pleiotrope Mutanten geprüft werden und somit eine Charakterisierung als "missense" - oder "nonsense"-Suppressoren ermöglichen. Zwei Klassen von "nonsense"-Suppressoren waren bereits bekannt. Die eine wirkte nur auf Mutanten vom am-Typ (z.B. Brenner et al., 1965 b), die andere auf Mutanten des am- und oc-Typs (Brenner et al., 1965 a). Darüberhinaus waren bereits bzw. sind jetzt bei einigen "missense"-Suppressoren (Brody u. Yanofsky, 1965) und "nonsense"-Suppressoren (Kaplan et al., 1965; Stretton et al., 1965; Weigert et al., 1965 b c, 1967 b) die unter ihrem Einfluß inkorporierten Aminosäuren bekannt, so daß auf diesem Weg in einfacher Weise die pleiotropen Mutationen charakterisierbar sein sollten.

Stamm	Suppressor	T4 am-Mutanten						T4 oc-Mutanten				
		amB17	amBH23	amN52	amBH230	amB272	amH36	X264	X511	UV375	N21	360 375
Ymel	suY	- +	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
HfrC	su1D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
"	su2D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
"	su4D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
"	su7D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
"	su8D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
"	su9D	- +	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
"	su3	- +	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
HfrH/HfrC	suc=su4									+	-	-
Ymel	su8	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
"	su7	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-

Tabelle 3. Suppressionsmuster verschiedener am- und oc-Suppressoren

Alle Stämme wurden in Vollmedium hochgezogen und mit der Oberagartechnik ausplattiert (Bode, 1963) und durch Auftropfen verschiedener Konzentrationen der angegebenen T4 am- und T4 oc-Phagenlysate auf Permissivität oder Nichtpermissivität geprüft. + = Wachstum, ± = schwache Suppression, solche von 10-20% des per definitionem permissiven Wirtes CR63 (Epstein et al., 1963), - = kein Wachstum, d.h. Wurfgrößen, die $<10^{-3}$ sind.

Zu diesem Zweck wurden Acetat-unabhängige Revertanten der O^0 -Typ Mutanten isoliert. Die noch nicht kartierten O^0 -Typ Mutanten Ac32 und Ac38, sowie Ac45 und die polare Mutante Ac7 fanden hierzu Verwendung. Auf den isolierten Revertanten wurden P1-Lysate hergestellt und der *ace*-locus *leu*-gekoppelt in den Hfr C_3 *leu*⁻ transduziert. Das Auftreten von Acetatauxotrophen unter den *leu*⁺-Rekombinanten zeigten an, daß die Reversionen an einem zweiten Ort liegen d.h., offenbar durch einen Suppressor hervorgerufen wurden. Unter den Reversionen von Ac32 fanden sich von 12 6, die durch die Wirkung von Suppressoren hervorgerufen wurden. Alle Suppressoren erwiesen sich als *cys*-gekoppelt, denn sie ließen sich sowohl in den Stamm Ac32 *cys*⁻ als auch in den Stamm Ac38 *cys*⁻ transduzieren, was darüberhinaus zeigt, daß sie auch die Mutante Ac38 supprimieren. Die Reversionen von Ac38 und Ac45 waren *leu*-gekoppelt und wurden daher nicht weiter untersucht. Von der polaren Mutante Ac7 (Abb.1) stellten sich 4 Reversionen von 7 als Reversionen am zweiten Ort heraus (diese Suppressoren wurden nicht lokalisiert).

Zur weiteren Charakterisierung der Suppressoren war es zunächst notwendig, sie als "missense" - oder "nonsense"-Suppressoren einzustufen. Letzteres ist am einfachsten durch die Permissivität für T4 am- (Epstein et al., 1963) und T4 oc-Mutanten (Brenner u. Beckwith, 1965) zu prüfen. Wie Tabelle 3 zeigt, ist der Hfr C nicht permissiv für T4 am- und T4 oc-Mutanten; er trägt also keinen Suppressor, während der Stamm YMel permissiv für T4 am-Mutanten ist (Henning et al., 1965 b) und, wie bereits gezeigt wurde, einen *try*-gekoppelten am-Suppressor besitzt. Tabelle 3 zeigt weiterhin, daß als Folge der Reversion von Ac32 zu *ace*⁺ alle 6 Isolate (*su1D*, *su2D*, *su4D*, *su7D*, *su8D*, *su9D*) T4 am-, nicht aber T4 oc Permissivität erlangt haben, d.h., daß es sich um am-Suppressoren handelt. Nach dem Suppressionsmuster ließen sich zwei Klassen unterscheiden, die einmal durch den Suppressor *su9D*, zum anderen durch die

Stamm	su ⁻	suY	su1D	su7	su8
HfrC ace ⁺	29	-	-	-	-
HfrC Ac32	<0,1	29(30)	8(10)	-	-
HfrC Ac38	<0,1	7(17)	29(31)	-	-
YMel ace ⁺	20	-	-	-	-
YMel Ac7	<0,1	<0,1	-	2	-
YMel Ac8	<0,1	<0,1	-	-	2
HfrH ace ⁺	21	-	-	-	-
HfrH Ac67	<0,1	5(40)	10(15)	-	-
HfrH Ac130	<0,1	10(31)	8(8)	-	-

Tabelle 4. Spezifische Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenasen supprimierter Acetatmangelmutanten und der entsprechenden Wildtypen. Die Zahlen in Klammern geben die spezifische Aktivität nach Zusatz von Decarboxylase an.

Isolate su1D, su2D, su4D, su7D und su8D vertreten werden, wobei su9D vom YMel-Typ zu sein scheint. Dieses unterschiedliche Suppressionsmuster zeigt sich auch in der unterschiedlichen Fähigkeit, die Mutanten Ac32, Ac38 und Ac130 zu supprimieren (Tabelle 4). Die Revertante des bereits früher isolierten Ac8 (also Ac8 su 8) (Henning et al., 1964 c) und des Ac7 (also Ac7 su7) supprimieren natürlich T4 am-Mutanten, weil sie im Stamm YMel sind, darüberhinaus aber auch T4 oc-Mutanten. Bemerkenswerterweise hat su8, der wie su c (Brenner u. Beckwith, 1965) 50 % mit try gekoppelt ist, ein von letzterem differierendes Suppressionsmuster und beide wieder ein anderes Suppressionsmuster als su7. Einschränkend muß hierzu aber auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund von su c und su8 verwiesen werden (s.u.). Wie Tabelle 4 zeigt, supprimieren die oc-Suppressoren wesentlich schlechter als die am-Suppressoren. Zusammenfassend kann also gesagt werden: 1.) Su8 und su7 sind oc-Suppressoren und somit Ac8 und Ac7 oc-Mutanten, zumal sie von suY nicht supprimiert werden. 2.) Su1D ist ein am-Suppressor mit anderem Suppressionsmuster als suY und daher Ac32 und Ac38 am-Mutanten. 3.) YMel trägt einen am-Suppressor, der der spontanen Mutation su9D gleicht. Es ist weiterhin damit gezeigt, daß zwar "nonsense" Mutationen wie Ac8, die zum Abbruch der Polypeptidsynthese im Strukturgen der Decarboxylase führen, die Synthese der Liponsäurereduktase-Transacetylase-Komponente verhindern, daß aber andere "nonsense" Mutationen im Strukturgen der Decarboxylase, wie Ac7, noch eine Restsynthese von Liponsäurereduktase-Transacetylase zulassen, also im eigentlichen Sinn polar sind.

Mit Ausnahme des Mutationsortes Ac45 ist somit die in Abschnitt 1 gestellte Frage eindeutig beantwortet. Alle anderen pleiotropen Mutationsorte im Strukturgen der Decarboxylase sind solche, die zum Abbruch der Polypeptidsynthese am Ort der Mutation führen, d.h. sie sind "nonsense" Mutationen vom am- oder oc-Typ.

Die Frage nach dem Mechanismus der pleiotropen Wirkung dieser Orte konnte daher neu formuliert werden: Warum kann Abbruch der Polypeptidsynthese im Strukturgen der Decarboxylase-Komponente zum vollständigen Syntheseblock der Liponsäurereduktase-Transacetylase-Komponente führen? Es sind zwei Möglichkeiten oder deren Kombination denkbar:

1.) Bei Kopplung von Polypeptid- und m-RNS-Synthese (Stent, 1964) wird keine m-RNS produziert oder sie wird gebildet aber bei fehlender Translation vorzeitig abgebaut (Attardi et al., 1963; Contesse et al., 1966).

2.) Ein bei der Induktion der Pyruvatdehydrogenase teilnehmender Anteil der Decarboxylase wird bei O^0 -Typ Mutationen nicht synthetisiert.

Träfe allein Möglichkeit 1) zu, so wäre unverständlich, warum Ac38 schlecht und Ac32 gut von suY, jedoch Ac32 schlecht und Ac38 gut von suID supprimiert werden, da ja beide am-Mutanten vom O^0 -Typ darstellen (Tabelle 4). Das Zutreffen von Fall 1) scheint daher zusätzlich die Möglichkeit 2) zu fordern.

Zur Lösung dieser Frage war es daher notwendig, nähere Kenntnisse über die Wirkung der Suppressoren auf die am-Orte im Strukturgen der Decarboxylase zu erhalten. Es wurden zwei Wege beschritten: a.) Studium der Wirkung verschiedener am-Suppressoren auf die verschiedenen am-Orte und b.) Studium des Wirkungsmechanismus des Suppressor-Gen-Produktes.

b) Wirkung von am-Suppressoren auf die Synthese der Pyruvatdehydrogenase

a) Isolierung eines den Suppressor suY tragenden defekten Phagen $\phi 80$

Zum Studium der Wirkung von Suppressoren auf verschiedene am-Orte wäre es zweifellos äußerst hilfreich, mit einem Suppressor arbeiten zu können, der in ein Episom oder einen spezialisiert transduzierenden Phagen inkorporiert ist. Die

enge Kopplung (50 %) bei der Transduktion von try mit dem Suppressor suY und die Entdeckung Matsushiros (1963), daß für den Phagen $\phi 80$ lysogene Zellen nach Induktion try-transduzierende Partikel entlassen können, die analog λ dg ihre Rezipienten zu Heterogenoten transduzieren, eröffnete die Möglichkeit, diesen Suppressor auf den Phagen $\phi 80$ zu translocieren.

Hierzu wurde der Stamm YMel $\phi 80^+$ mit UV induziert und mit dem so erhaltenen Lysat der Stamm Ac32 try⁻ infiziert. Unter etwa 10^9 bis 10^{10} infizierten Bakterien trat ein ace⁺try⁺ Transduktand auf. 8 von 15 Isolaten erschienen als Heterogenoten: Sie entließen nach UV-Induktion try⁺- und suY⁺-transduzierende Partikel. Der transduzierende Titer dieser sogenannten HFT-Lysate lag etwa eine Zehnerpotenz unter dem Titer der Wildtypphagen. Weitere Evidenz dafür, daß es sich um Heterogenoten handelt, zeigte das außerordentlich starke Segregieren in Vollmedien (bis zu 70 % bei Animpfen von 1:100), während in selektiven Medien nur 1-5 % der Population try⁻, ace⁻ Zellen enthielten.

Um zu prüfen, ob der transduzierende $\phi 80$ ein defekter Phage ist, oder sich ähnlich wie der try-transduzierende $\phi 80$ pt (Matsushiro, 1963) lytisch vermehren kann, wurde ein HFT-Lysat mit Oberagar auf dem Stamm W1485 plattiert, 30 "plaques" abgeimpft und lytisch vermehrt. Keines der Lysate vermochte die Merkmale try⁺ und suY⁺ zu transduzieren. Weiterhin wurde Ac32 try⁻ mit einem dieser HFT-Lysate mit einer Multiplizität von 0.1 infiziert und die try⁺ ace⁺-Clone nach Isolierung induziert. Kein Transduktand war in der Lage, transduzierenden oder lytischen $\phi 80$ zu entlassen. Der transduzierende $\phi 80$ ist also defekt und kann sich ohne Hilfe eines Helfer- $\phi 80$ nicht vermehren. $\phi 80$ tsuY trägt, wie sich mit den entsprechenden try-Mangelmutanten leicht prüfen ließ, das Tryptophan-Synthetase A-Gen, aber nicht mehr das Gen für die Anthranilsäure-Synthetase. Die Lokalisation des Suppressors wird im Abschnitt über Kartierung näher erörtert.

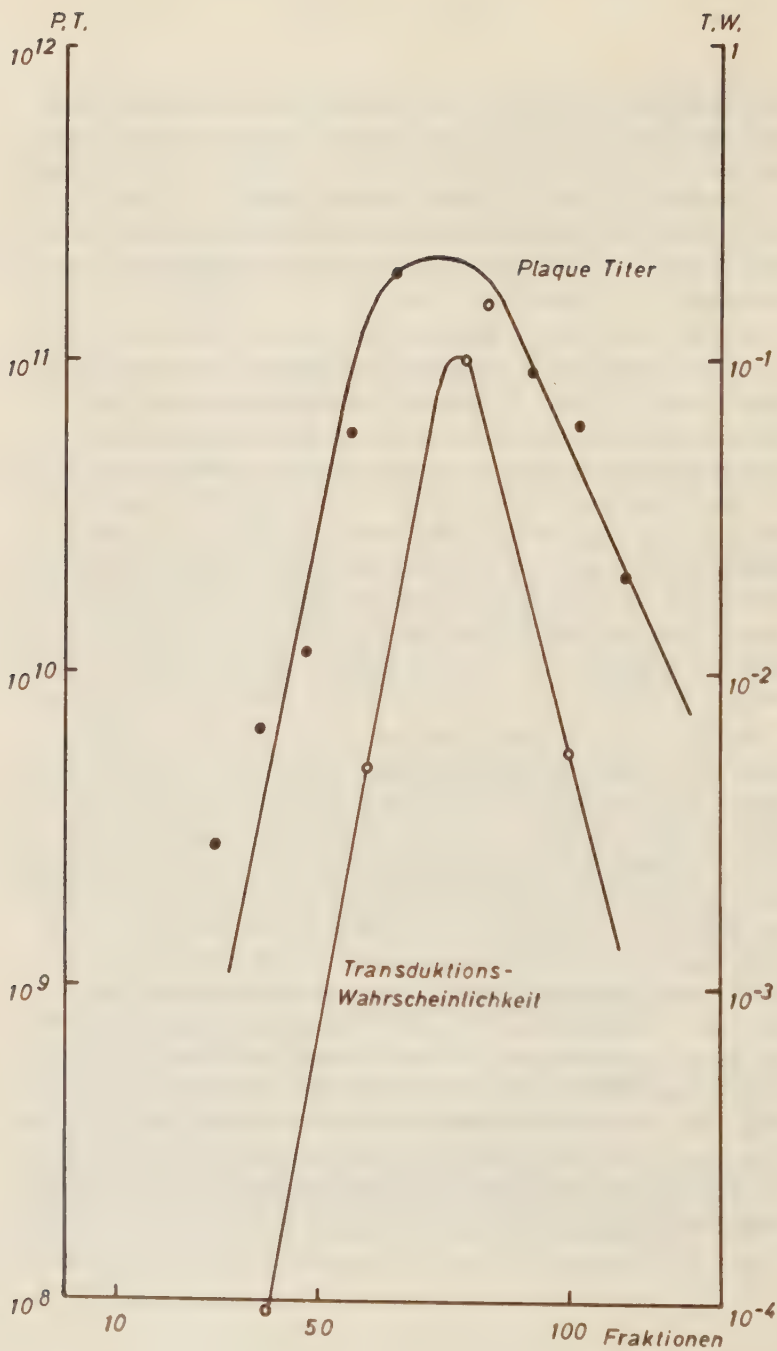
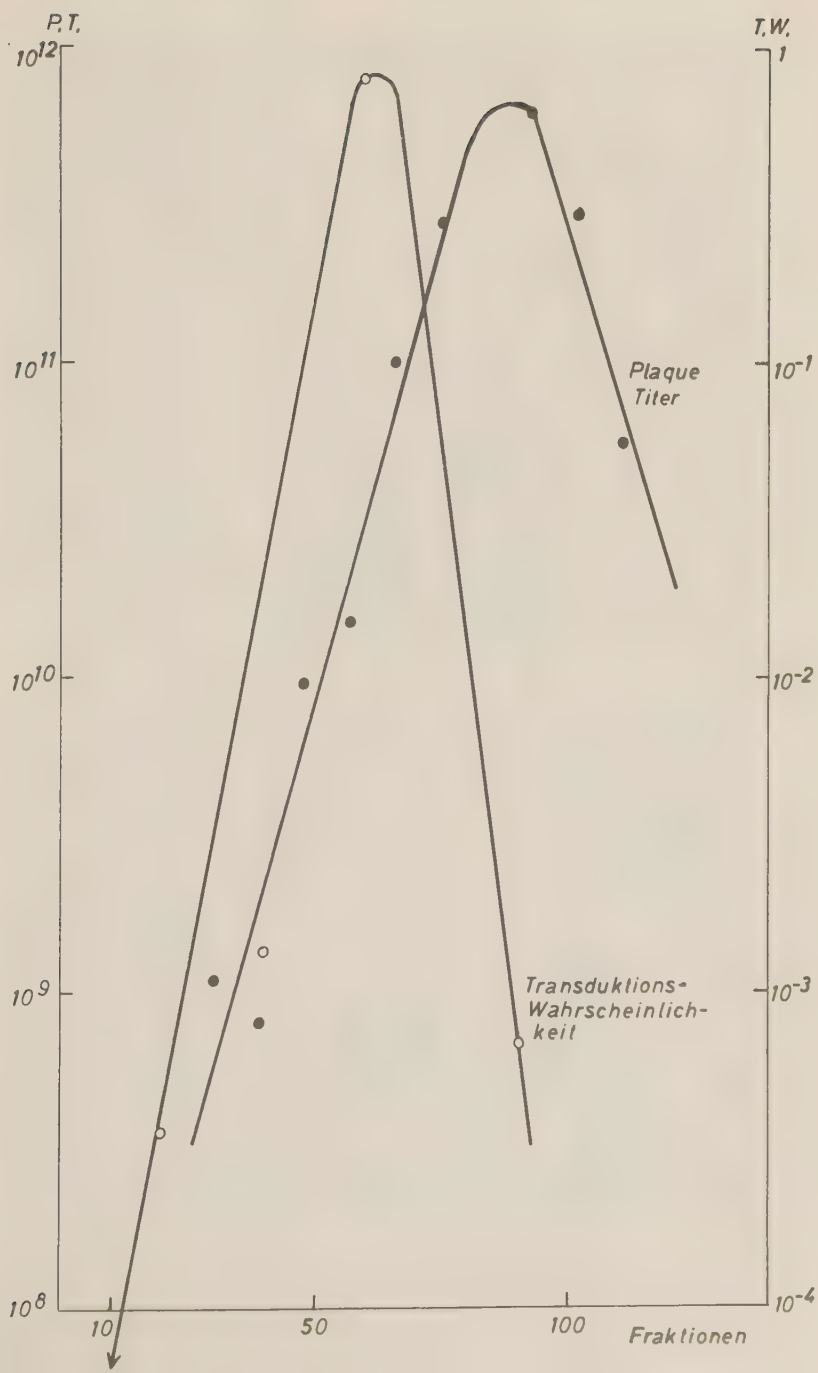


Abb. 4



Stamm	Genetische Konstitution am am-Suppressor locus	Erhalten durch	Pyruvatdehydrogenase spez. Akt.
1 YMelA33	try ⁻ , suY ⁺		26
2 YMelA33	try ⁺ , suY ⁺	Transduktion des try ⁺ - Alleles von HfrC	30
3 YMelA33	try ⁺ , suY ⁻	Gekoppelte Transduktion des try ⁺ - u. des suY ⁻ - Alleles von HfrC	30
4 HfrC2	try ⁻ , suY ⁻		23
5 HfrC2	try ⁺ , suY ⁻	Transduktion des try ⁺ - Alleles von YMel	33
6 HfrC2	try ⁺ , suY ⁺	Gekoppelte Transduktion des try ⁺ - u. des suY ⁺ - Alleles von YMel	33

Tabelle 5. Spezifische Aktivitäten in Stämmen mit verschiedener genetischer Konstitution am YMel am-Suppressor locus und dem Wildtyp-ace-locus.

Um bei Infektions-Experimenten die Abtötung der Zellen durch den Wildtyp- $\phi 80$ zu vermeiden, wurde versucht, durch Dichtegradienten-Zentrifugation in CsCl lytischen und transduzierenden Phagen zu trennen. Wie Abb.4 zeigt, war das bei dem vorliegenden HFT-Lysat nicht möglich, und 5 andere geprüfte HFT-Lysate zeigten das gleiche Verhalten. Von der Beobachtung ausgehend, daß Hybride der Phagen λ und $\phi 80$ unterschiedliche Dichten aufweisen können (Signer, 1964; Franklin et al., 1965), wurde daher, wie im metho- dischen Teil näher ausgeführt, ein λ - $\phi 80$ Hybrider $i^{\lambda h \phi 80}$ isoliert, der in der Lage war, $\phi 80$ dtsuY zu helfen. Abb.5 zeigt die Dichteverteilung des HFT-Lysates VIII $i^{\lambda h \phi 80} / \phi 80$ dtsuY. Helfer und transduzierende Partikel lassen sich, wenn auch nicht besonders gut, trennen. Wenngleich es so- mit möglich war, transduzierende $\phi 80$ dtsuY und Helfer $i^{\lambda h \phi 80}$ zu trennen, wurden wegen der technischen Schwierig- keiten in der Regel dennoch die HFT-Lysate verwendet.

B) Wirkung von Suppressoren auf verschiedene am-Orte

Arbeiten in der Gruppe von Brenner (Kaplan et al., 1965) haben gezeigt, daß verschiedene am-Suppressoren mit unter- schiedlicher Wirksamkeit am-Mutationen im Phagen T4 suppri- mieren. Darüberhinaus beobachteten Hill und Stent (1965), daß sich am-Suppressoren (oder ihre Allele) gegenseitig in ihrer Wirkung beeinflussen können. Der auf den Phagen $\phi 80$ translocierte Suppressor zeigte (Tabelle 7), daß dieses su^+ -Allel über das su^- -Allel dominant ist. Damit ergab sich die Möglichkeit, in einfacher Weise die Wirkung von Suppres- soren in verschiedenen Anordnungen auf die am-Orte in der Pyruvatdehydrogenase zu studieren. Dazu mußte zunächst aus- geschlossen werden, daß $\phi 80$ dtsuY, bzw. die auf diesen trans- locierte Region einen Einfluß auf die Synthese der Pyruvat- dehydrogenase des Wildtyps hat. Tabelle 5 zeigt, daß das offenbar nicht der Fall ist. Die durch P1-Transduktion her- gestellten Stämme zeigen keinerlei Abhängigkeit der Höhe des Pyruvatdehydrogenase-Spiegels von der An- oder Abwesenheit

Stamm	Genetische Kon- stitution am am- Suppressor locus	Suppressor- Konstitution erhalten durch	Segre- gation	Maximale Rekombi- nation	Anzahl Isolate	Pyruvat- dehydro- genase spez. Akt.
HfrC2 ($\phi 80, \phi 80\text{dtsuY}$)	$\text{try}^- \text{suY}^- / \text{try}^+ \text{suY}^+$	Infektion von HfrC2 mit $\phi 80$, $\phi 80\text{dtsuY}$	6%	8%	1	29
			6%		2	29
HfrC2 ($\phi 80, \phi 80\text{dtsuY}$)	$\text{try}^- \text{suY}^+ / \text{try}^+ \text{suY}^+$	1. Selektion einer try^- Mutante in HfrC2suY 2. Infektion mit $\phi 80$, $\phi 80\text{dtsuY}$	<1%		1	34
			<1%	<1%	2	35

Tabelle 6. Spezifische Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase im HfrC2, der homo- oder heterogenot für den am-Suppressor suY ist.

Stamm	Genetische Konstitution am am-Suppressor Locus	Suppressor-Allele erhalten durch	Segregation Maximale Rekombination	Zahl d. Pyruvatdehydrogenase spez. Akt. Isolate ohne / mit Zusatz der Decarboxylase Komponente
1 Ac32	su ⁻ , try ⁻	-	-	<0.1
2 Ac32suY	a. suY ⁺ , try ⁺	Transduktion des try-gekoppelten suY ⁺ Locus	-	29 30
3 Ac32suid	b. suY ⁺ , try ⁻	von YMel	-	28 31
4 Ac32(ø80, ø80dtsuY)	suid ⁺ , try ⁻ suY ⁻ try ⁻ /suY ⁺ try ⁺	Mutation Infektion des Stammes 1 mit ø80, ø80dtsuY	3% 4%	8 18 23 24
5 Ac32suY(ø80, ø80dtsuY)	suY ⁺ try ⁻ /suY ⁺ try ⁺	Infektion des Stammes 2b mit ø80, ø80dtsuY	<1% <1% 1%	20 36 39
6 Ac32suid(ø80, ø80dtsuY)	suid ⁺ try ⁻ /suY ⁺ try ⁺	Infektion des Stammes 3 mit ø80, ø80dtsuY	0.6% 3% 3% <1%	28 29 27 23.5 32.1

Tabelle 7 a). Spezifische Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase im Stamm Ac32 unter verschiedenen genetischen Bedingungen der am-Suppression

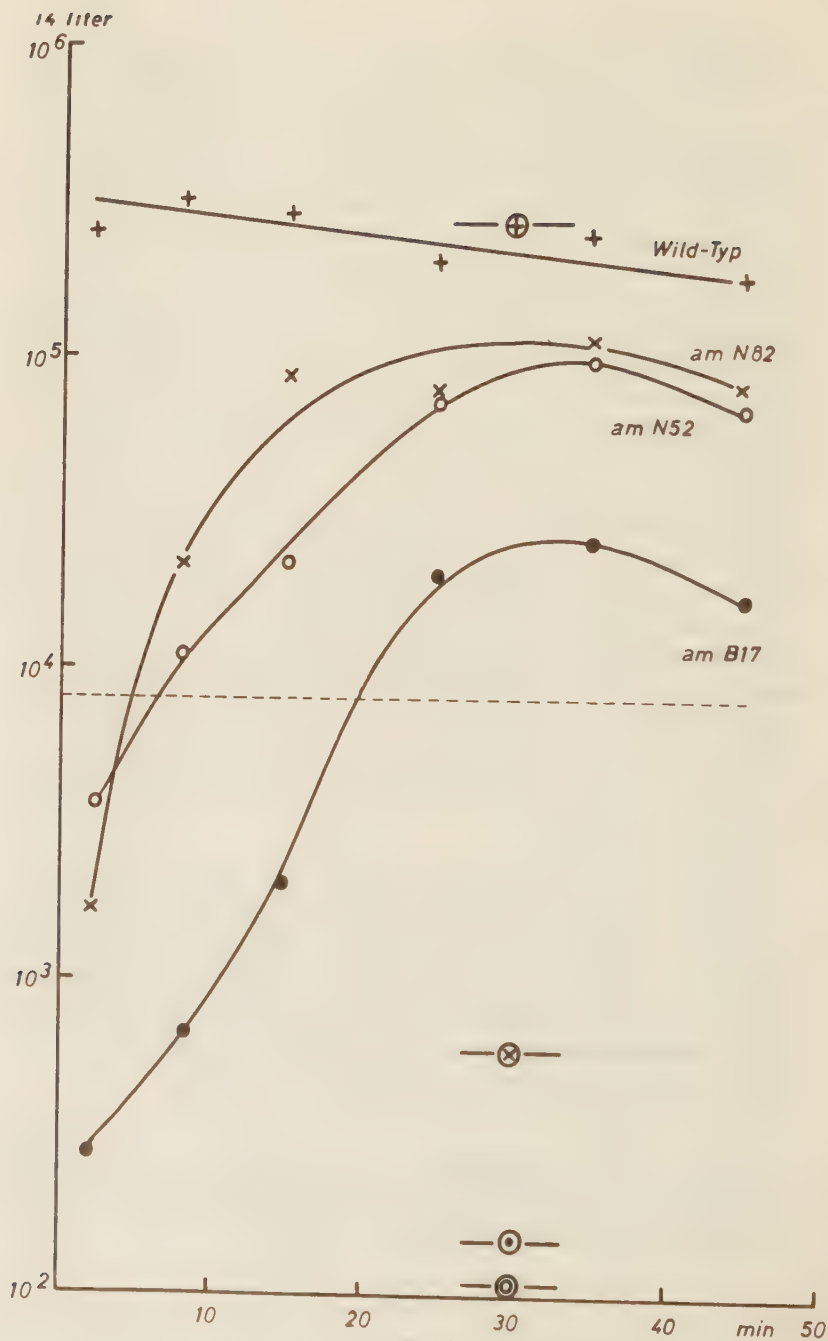
Stamm	Genetische Konstitution am am-Suppressor Locus	Suppressor-Allele erhalten durch	Segregation	Maximale Rekombinat.	Zahl d. Pyruvatdehydrogenase spez. Akt. Isolate ohne / mit	Zusatz der Decarboxylase Komponente
7 Ac38	su ⁻ , try ⁻	-	-	-	<0.1	<0.1
8 Ac38suY	a. suY ⁺ , try ⁺	Transduktion des try-gekoppelten suY ⁺ Locus	-	-	7	17
9 Ac38su1D	b. suY ⁺ , try ⁻ su1D ⁺ , try ⁺	von YMel Transduktion des try-gekoppelten su1D-Alleles von Ac32su1D try ⁺	-	-	6 29	17 31
10 Ac38(ø80, ø80dtsuY)	su ⁻ try ⁻ / suY ⁺ try ⁺	Infektion des Stammes 7 mit ø80, ø80dtsuY	3%	<1%	1	10
			2%		2	8,5
					3	18
					4	17
11 Ac38suY(ø80, ø80dtsuY)	suY ⁺ try ⁻ / suY ⁺ try ⁺	Infektion des Stammes 8b mit ø80, ø80dtsuY	1%		1	25
			8%		2	25
			60%	<1%	3	33

Tabelle 7 b). Spezifische Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase im Stamm Ac38 unter verschiedenen genetischen Bedingungen der am-Suppression

des Suppressors suY . Ebenso lassen die mit dem Stamm Hfr C_2 konstruierten Heterogenoten, selbst wenn das suY -Allel zweimal vorhanden ist, keine außergewöhnlich hohen oder niedrigen spezifischen Aktivitäten erscheinen (Tabelle 6). Unter den hier benutzten Wachstumsbedingungen hat also die mit dem Phagen P_1 transduzierte oder auf den Phagen $\phi 80$ translocierte Region keinen meßbaren Einfluß auf die Synthese der Pyruvatdehydrogenase in Wildstämmen. Die Wirkung der zwei am-Suppressoren suY und $suID$ auf die beiden Mutanten $Ac32$ und $Ac38$ und deren Auswirkung auf die Pyruvatdehydrogenase faßt Tabelle 7 zusammen. Anstieg der spezifischen Aktivitäten nach Zugabe von Decarboxylase (z.B. $Ac38$ suY von 7 auf 17) ist meist ein Anzeichen für eine defekte Decarboxylase-Komponente. Wenn dies auch nicht in allen Fällen nachgeprüft wurde*, so drückt sich doch in der spezifischen Aktivität nach Zugabe von Decarboxylase die Gesamtkapazität der Restkomplex-Synthese aus. Zweifelhafte ist angesichts der Schwankungen in den enzymatischen Aktivitäten, ob entweder eine Konkurrenz zwischen su^- und su^+ -Produkten besteht, oder das su^+ -Allel nach Inkorporation in das Phagen-Chromosom schlechter ausgeprägt wird als nach Inkorporation in das Bakterien-Chromosom. Auch scheinen die höchsten spezifischen Aktivitäten bei suY^+/suY^+ Homogenoten aufzutreten. Bei der Konfiguration $suID^+/suY^+$ sind die Wirkungen der beiden Suppressoren nicht additiv, sondern es scheint der wirksamere (suY) für die Höhe des Enzym-Spiegels bestimmend zu sein.

Es war somit gezeigt, daß 1.) suY^+ dominant über suY^- ist, 2.) es keine wesentliche Konkurrenz zwischen su^- und su^+ -Produkt bzw. zwischen den su^+ -Produkten verschiedener Suppressoren gibt, 3.) das su^+ -Gen, wenn überhaupt, dann nur schwach einen Gen-Dosis Effekt ausüben kann. Es sprach daher nichts dagegen, durch Infektionsexperimente mit $\phi 80dsuY$ das zeitliche Erscheinen des Suppressorgen-Produktes und dessen Wirkung auf verschiedene am-Orte zu studieren.

* Andere Ursachen sind natürlich auch denkbar, wie Produktion von weniger Decarboxylase oder mehr Restkomplex als für die Synthese von komplettem Komplex erforderlich ist.



spez.
Akt.

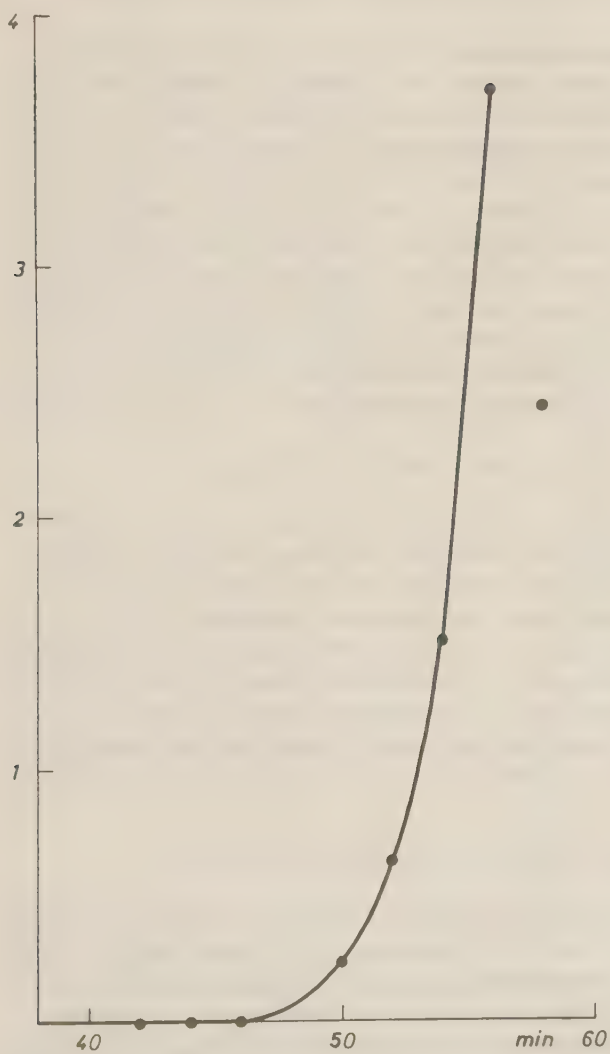


Abb. 7

γ) Kinetik des Erscheinens der Suppressorgen-Funktion und Versuch der Bestimmung der Synthesesequenz der Komponenten des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes.

Da der transduzierende $\phi 80$ t_{suY} und sein Helfer VIII i^h $\phi 80$ nicht ohne erheblichen Aufwand in größeren Mengen gut zu trennen sind, wurden, wie bereits erwähnt, in den folgenden Infektionsexperimenten Rohlysate verwendet. Es wurde nur einmal $\phi 80$ t_{suY} in kleiner Menge gereinigt und seine Fähigkeit geprüft, in Hfr C su⁻-Zellen nach Infektion T4 am-Mutanten zu supprimieren. Da das Ergebnis das gleiche war wie bei Infektion mit den ursprünglichen HFT-Lysaten, wurde auch deswegen auf eine weitere Verwendung von gereinigtem $\phi 80$ t_{suY} verzichtet. Die zeitliche Kinetik des Erscheinens der Suppressorgen-Funktion wurde sowohl mit T4 am-Mutanten als auch mit am-Mutanten im ace-locus studiert.

i) Suppressionskinetik von T4 am-Mutanten

Abb.6 zeigt ein typisches Infektionsexperiment. Während sich beim T4 Wildtyp kein Effekt zeigt, steigt die Fähigkeit, T4 am N82 und am N52 zu produzieren, um fast zwei Zehnerpotenzen, nicht ganz bis zur Wildtypkontrolle an. Am B17 wächst nur sehr schwach auf Zellen mit dem Suppressor suY. Die Suppression ist daher wesentlich schlechter, auch erscheint sie aus ungeklärten Gründen später (s.u.). Das Abnehmen der T4-Titer nach 30 min. ist sehr wahrscheinlich auf das Lysieren der mit $\phi 80$ infizierten Zellen zurückzuführen.

ii) Suppressionskinetik der ace-am-Mutanten

Da mit den üblichen enzymatischen und immunologischen Methoden in allen O⁰-Typ-Mutanten, also auch Ac32 und Ac38, keinerlei Pyruvatdehydrogenase-Aktivität nachweisbar ist, d.h. weniger als 0.5 % als in den Wildtypzellen gefunden werden, konnte auch hier die Kinetik der Suppression verfolgt werden. Abb.7 zeigt das Erscheinen der Pyruvatdehydro-

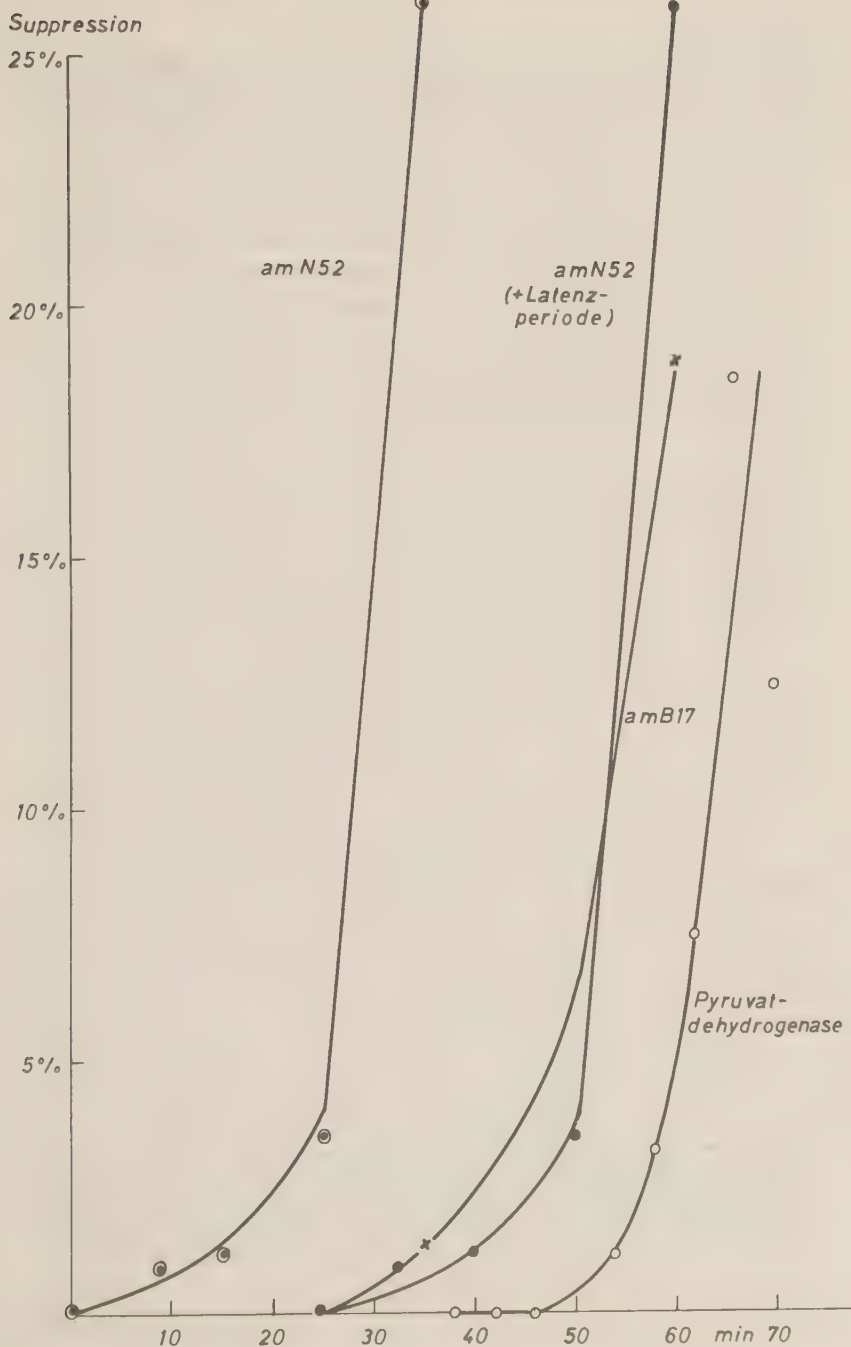


Abb. 8

*Jpm des frei-
gesetzten CO₂*

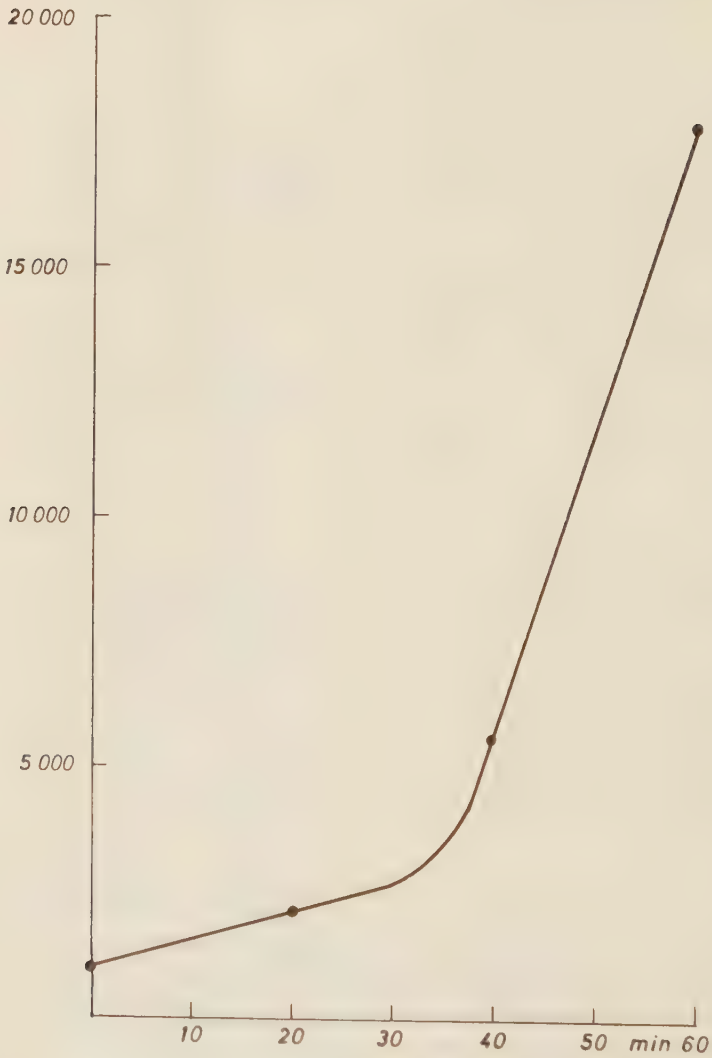


Abb. 9

genase-Aktivität nach Infektion mit einem HFT-Lysat bei 37°C. Enzymaktivität läßt sich hier nach etwa 40 bis 50 min. nachweisen. Die weitere Zunahme der Aktivität erfolgt linear.

Vergleicht man die Kinetiken der T4 am-Suppression und das Erscheinen der Pyruvatdehydrogenase nach Infektion, so zeigen sich zeitliche Unterschiede (Abb.8). Die Pyruvatdehydrogenase-Aktivität erscheint etwa 40 min. später als die Fähigkeit, T4 am N52 zu supprimieren. Selbst unter der Annahme, daß in der Latenzperiode weiterhin Suppressorprodukt produziert werden kann, verbleibt noch eine Zeitdifferenz von etwa 20 min. (Abb.8). Erstaunlich ist auch hier das verzögerte Erscheinen der Suppression des T4 am B17.

Die lange Verzögerungsphase bis zum Erscheinen der Pyruvatdehydrogenase-Aktivität ließ daran denken, daß bei dieser Suppression im Gegensatz zu der der T4 am-Mutanten zunächst der Induktionsmechanismus für den Enzymkomplex in Gang kommen muß. Der Prozeß bestünde mit anderen Worten aus zwei aufeinanderfolgenden Schritten: 1.) Suppression des am-Codons und Synthese der Decarboxylase Komponente. 2.) Induktion des Enzymsystems mit Hilfe der gebildeten Decarboxylase. Ein solcher Induktionsprozeß konnte als Ursache der Verzögerung ausgeschlossen werden, denn er sollte nicht bei der Suppression einer am-Mutation im Strukturgen der Transacetylase auftreten. Abb.9 zeigt jedoch, daß auch hier das erste Enzym nach 35 min. meßbar wird, obgleich die Mutante Ac63 eine große Menge (spez. Akt. = 60) von Decarboxylase synthetisiert. Das gleiche späte Auftreten wurde bei den gleichen Versuchen mit O⁰-Typ-Mutanten im Gen der β -Galaktosidase gemessen. (Smith et al., 1966). Auch hier ist das Phänomen unverständlich, zumal die Experimente im vollinduzierten Zustand, d.h. in Gegenwart von Isopropylthiogalaktosid ausgeführt wurden.

iii) Synthesesequenz der Enzymkomponenten.

Die Lage der O⁰-Typ Mutanten Ac8 und Ac45, sowie die der polaren Mutanten Ac7 und Ac13 (Abb.1) geben die Richtung der Polarisierung in diesem Genkomplex an. Polarisationsrichtung

Jpm des frei-
gesetzten CO_2

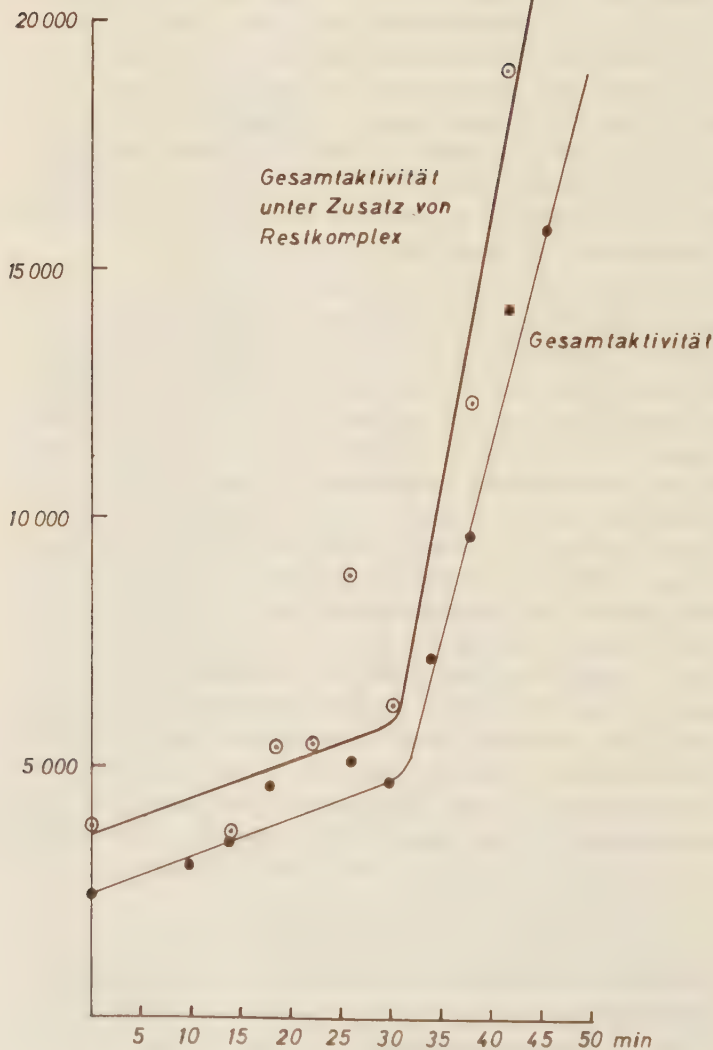


Abb.10

und Richtung der Translation scheinen in verschiedenen Operonen identisch zu sein (lac: Alpers u. Tomkins 1965, 1966; Newton et al., 1965; Katze et al., 1966; his: Goldberger u. Berberich, 1965; Martin et al., 1966; gal: Starlinger et al., pers.Mitt.), als gesichert kann dies für das try-Operon angesehen werden (Yanofsky et al., 1963, 1966, 1967; Guest u. Yanofsky, 1966). Die Suppression von ace-am-Mutationen durch $\phi 80\text{dtsuY}$ ermöglicht es, experimentell zu prüfen, ob zeitliche Unterschiede im Erscheinen der Enzymkomponenten festzustellen sind, d.h. ob, wie nach dem Vorausgesagten vielleicht zu erwarten wäre, die Decarboxylase vor dem Restkomplex erscheint. Mit einem empfindlicheren Enzymtest, der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat als Substrat benutzt (siehe Methoden) und das entstehende $^{14}\text{CO}_2$ mißt, wurde die Kinetik des Erscheinens von Gesamtaktivität und das der Decarboxylase gemessen (Abb.10). Innerhalb der Meßgenauigkeit sind die beiden Kurven kongruent, d.h., die Decarboxylase-Komponente läßt sich nicht eher nachweisen als der Gesamtkomplex. Die Genauigkeit des Testes gestattet den Nachweis von einem Decarboxylase-Äquivalent pro Zelle (siehe Methoden; entsprechend etwa 12 Molekülen), der Aufbau eines Decarboxylase-"pools", der größer als ein Decarboxylase-Äquivalent ist, über einen Zeitraum von länger als 3 min. ist damit ausgeschlossen. Nach Synthese von 12 Molekülen Decarboxylase (einem Äquivalent) ist daher offenbar schon 1 Molekül Restkomplex vorhanden, das dann mit der Decarboxylase zum Gesamtkomplex zusammentritt.

Ein Nachteil bei diesen Versuchen ist, daß nicht jede Zelle von $\phi 80\text{dtsuY}$ infiziert wird und daher die Nachweisbarkeit des Enzyms bzw. der Komponenten unter der erwähnten liegt. So war es ein glücklicher Zufall, daß im späteren Verlauf der Versuche ein Temperatur-empfindlicher am-Suppressor als Derivat von suID isoliert wurde. Dieser Suppressor suID^{-50} wirkt bei niedrigen Temperaturen (22°C) und funktioniert nicht mehr bei höheren Temperaturen (ab 30°C). Nach Wachstum des Stammes Ac32 suID^{-50} bei 40°C kann man daher einfach durch

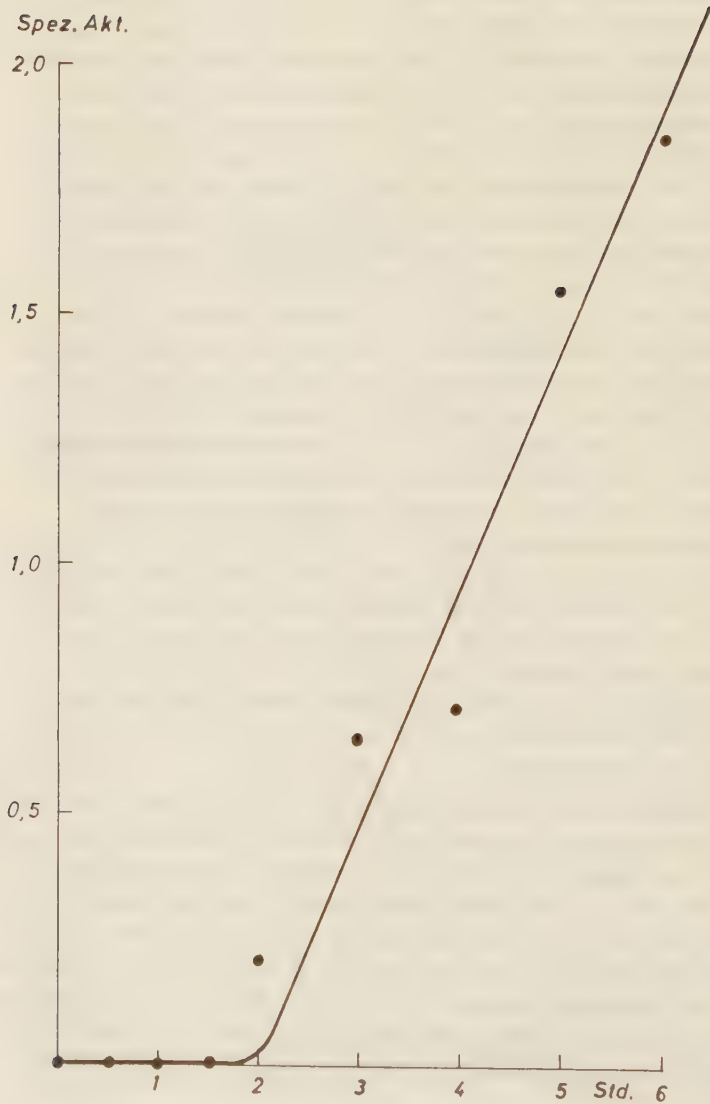


Abb. 11

spez.
Akt.

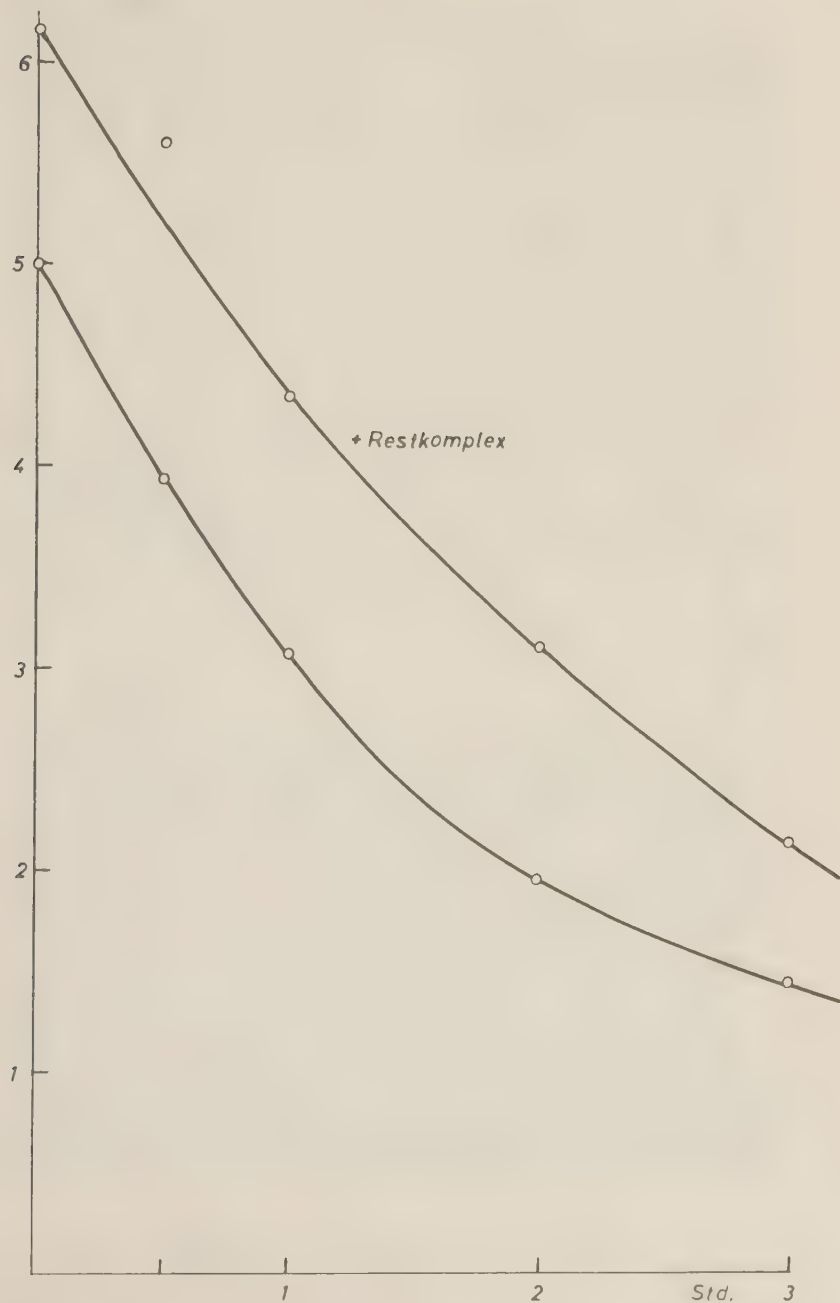


Abb. 12

*Jpm des frei-
gesetzten CO₂*

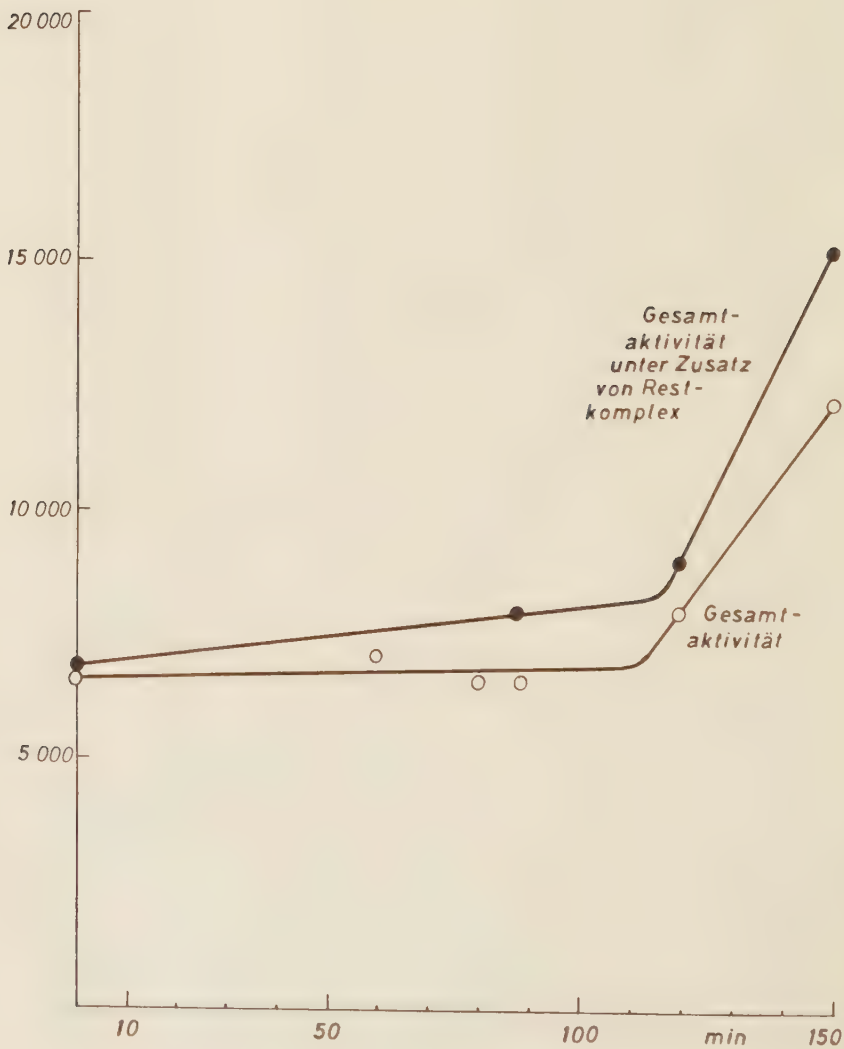


Abb. 13

Senken der Temperatur auf 22°C die Suppression und damit die Enzymsynthese starten. Abb.11 zeigt eine solche Kurve, bei der die Suppression nach etwa 2 Std. wirksam wird. Durch die umgekehrte Änderung der Temperatur von 22°C auf 40°C wird das sofortige Aufhören der Suppression und damit das Ausverdünnen des Enzyms erreicht (Abb.12). Der Grad der Ausverdünnung hängt natürlich von der Anzahl der Teilung der Zellen bis zur stationären Phase ab. Daß nicht etwa Restkomplex durch die Temperaturerhöhung denaturiert wird und dadurch ein Verschwinden von Gesamtaktivität vortäuscht, zeigt die Kurve unter Zusatz von Restkomplex. Die niedere Temperatur (22°C) und das Wirksamwerden des Suppressors in jeder Zelle läßt diesen Stamm ideal für genaue Messungen von Enzymsynthese-Kinetiken erscheinen. Abb.13 zeigt, daß das Erscheinen und die Zunahme der Gesamtaktivität und Decarboxylase-Aktivität innerhalb der Fehlergrenze zeitlich nicht zu trennen sind. Also auch unter diesen Versuchsbedingungen kann hier kein sequentielles Erscheinen der Enzymkomponenten festgestellt werden.

δ) "Nicht-Supprimierbarkeit" von am-Orten durch am-Suppressoren

In den Abschnitten 2a und 2by war kurz erwähnt worden, daß verschiedene am-Suppressoren einen am-Ort mit unterschiedlicher Wirksamkeit supprimieren können. Tabelle 4 gibt die Verhältnisse für Ac32, Ac38, Ac67 und Ac130 wieder. Während Ac32 von suY gut und von suID schlecht supprimiert wird, ist bei Ac38 das Umgekehrte der Fall. Sowohl Ac67 als auch Ac130 werden von suY, was die Restkomplexsynthese betrifft, besser supprimiert als von suID. Doch scheint die von suY supprimierte Decarboxylase defekt zu sein. Der Grund für das verschiedene Verhalten dieser beiden am-Suppressoren gegenüber verschiedenen am-Orten ließe sich zwanglos erklären, wenn man annimmt, daß beide Suppressoren verschiedene Aminosäuren in das Protein einsetzen. Im Falle des z.B. von suY supprimierten Ac67 liegt also ein gewisser

Stamm	Segregation	Maximale Rekom- bination	Pyruvatdehydrogenase (spezifische Aktivitäten)	
			ohne	mit
			Zusatz der Decarboxylase Komponente	
1 AB312	-	-	29	50
2 Ac32 AB312	-	-	<0.1	<0.1
3 Ac38 AB312	-	-	<0.1	<0.1
4 Ac32 AB312 (ø80, ø80dtsuY)	<1%	50%	9	12
5 Ac38 AB312 (ø30, ø80dtsuY)	44%	<1%	2	5

Tabelle 8. Suppression durch suY im Stamm AB312

AB312 ist try⁺ und kann daher nur durch Selektion auf ace⁺ erfolgreich lysogenisiert werden. Im Gegensatz zu anderen Pyruvatdehydrogenase- Wildtyp-Stämmen zeigt AB312 nach Zusatz von Decarboxylase ein Ansteigen der spezifischen Aktivität. Der Grund für dieses Verhalten ist unbekannt.

Grad von nonsense zu missense Suppression vor (funktionell betrachtet!) als dessen Extrem man eine nicht mehr funktionsfähige Decarboxylase neben dem Restkomplex erwarten muß. Doch sollte selbst ein "nonsense" zu "missense" Suppression immer den polaren Effekt der O^0 -Typ Mutanten soweit aufheben, wie es der Wirksamkeit eines gegebenen Suppressors entspricht.

Es war bereits in einer früheren Studie gezeigt worden (Henning et al., 1965 b), daß es Suppressoren gibt, die nicht in der Lage sind, Gesamtaktivität oder Restkomplex in der Zelle erscheinen zu lassen. Einer dieser Suppressoren ist *su2*, der in dem Stamm AB312 vorkommt (E. Signer, pers. Mitt.). Acetat-Auxotrophe dieses Stammes, Ac32 AB312 und Ac38 AB312 konnten durch *leu*-gekoppelte P1-Transduktion erhalten werden. Die Anwesenheit des Suppressors *su2* wurde durch Wachstum der T4 am-Mutanten am B17, am N52 und am N82 demonstriert. In diesen Stämmen war weder Restkomplex festzustellen, noch nach der Doppeldiffusionsmethode nach Ouchterlony (1958) kreuzreagierendes Material der Decarboxylase zu finden. Nach Lysogenisierung mit $\phi 80$ $\phi 80$ *tsuY* wird wieder Pyruvatdehydrogenase synthetisiert (Tabelle 8). Durch die hohen Segregations- bzw. Rekombinationsraten der Heterogenoten konnte nicht entschieden werden, ob hier eine Konkurrenz zwischen *suY* und *su2* eine Rolle spielt. Das Wirken der *suY*-spezifischen Suppression ließ sich auch durch das gute Wachsen des T4 am B272-S1 (siehe Methoden) auf diesen beiden Stämmen zeigen, da dieser Phage auf AB312 sehr schlecht wächst, auf YMel aber gut vermehrt wird. Die Interpretation dieser Beobachtung ist schwierig. Offenbar supprimiert *su2* die beiden am-Mutanten Ac32 und Ac38 nicht. Das Fehlen von Restkomplex und defekter Decarboxylase zeigt, daß der polare Effekt der Mutation nicht aufgehoben wird. Wenngleich die Unauffindbarkeit der defekten Decarboxylase noch nicht besagt, daß sie auch tatsächlich nicht synthetisiert wird (sie könnte beispielsweise nach der Synthese sofort ausfallen und sich dadurch der immunologischen Feststellung entziehen),

sollte jedenfalls die Polarisierung wenigstens partiell verschwinden. Es ist daher die Möglichkeit einer "nonsense" zu "missense" Suppression, aus der eine für die hypothetische Induktion der Pyruvatdehydrogenase nicht mehr funktionsfähige Decarboxylase-Komponente hervorgeht, nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen, zumal es gewisse Hinweise gibt, daß die Decarboxylase bei der Induktion der Pyruvatdehydrogenase eine Rolle spielen könnte (Henning et al., 1966).

Die hier angeschnittenen Probleme zeigen, daß man sich beim Studium der Wirkung von Suppressoren auf am-Orte nicht mit der rein genetischen Charakterisierung der Suppressoren zufrieden geben kann. Zur Protein-chemischen Beurteilung des durch den Suppressor restaurierten Genproduktes ist es zunächst wichtig, die von dem Suppressor inkorporierte Aminosäure zu kennen. Weiterhin ist der Wirkungsmechanismus des Suppressorproduktes von Bedeutung: Handelt es sich um eine Nukleinsäure oder ein Protein und wo greift das Produkt in die Peptid-synthetisierende Maschinerie ein?

c) Eigenschaften und Wirkungsweise der am-Suppressoren

α) Charakterisierung als Punktmutationen und Kartierungen

Der am-Suppressor suY stammt, wie schon erwähnt, aus dem Stamm YMel, während der Suppressor suID als ace^+ -Reversion in dem Stamm HfrC₂ Ac32 isoliert wurde. Auch für suY ließ sich sehr wahrscheinlich machen, daß er Folge einer Punktmutation ist. Ac32suY wurde nach Mutagenese mit Diäthylsulfat der Selektion für Nichtpermissivität gegenüber dem Phagen T4 am N52 unterworfen (Benzer u. Champe, 1961). Unter solchen Isolaten fand sich ein Stamm, Ac32suY Nr.4, der Acetat-auxotroph geworden war und mit ϕ 80dtsuY supprimierbar war. Von 8 ace^+ -Revertanten des Ac32suY Nr.4 waren 4 gleichzeitig wieder permissiv für T4 am N52 geworden. Weiter konnte mit einem P1-Lysat, das auf einer try^+ -Revertante von Ac32suY Nr.4 erhalten wurde, Ac32suY try^- mit 55 % Kopplung zu try^+

	Vollmedium	Minimalmedium
HfrC su ⁻ try ⁻ P1 ^S	33 min	60 min
HfrC su ⁻ try ⁻ P1 ⁺	52 min	60 min
HfrC su1D try ⁺ P1 ⁺	51 min	75 min
HfrC Ac32 su1D try ⁺ P1 ^S	27 min	75 min
HfrC Ac32 su1D try ⁻ P1 ^S	-	-
HfrC Ac32 suY try ⁺ P1 ⁺	-	60 min
Ymel P1 ^S	-	48 min

Tabelle 9. Generationszeiten von Wild- und Suppressor-Stämmen in Minimal- und Vollmedium. Die Teilungszeiten sind unabhängig vom Vorhandensein eines Suppressors, scheinen aber von dem Prophagen P1 kc beeinflußt zu werden.

Donor	Rezipient	SM	NSM	NSM ⁺ /SM ⁺	Kopplung
Ac32 su9D try ⁺ cys ⁺	Ac32 try ⁺ cys ⁻	cys ⁺	ace	19/385	5%
Ac32 su9D try ⁻	H12 UDPG ⁻	UDPG ⁺	pho	30/30	100%
HfrC1 try ⁺	Ac32 suY try ⁻	try ⁺	ace	251/532	47%
				160/297	54%
Yhel	H12 UDPG ⁻ try ⁺	UDPG ⁺	pho	10/10	100%
Yhel	HfrH R ⁻ try ⁺ cys ⁻	cys ⁺	am	4/30	13%
Ac32 suY ⁻ try ⁺ /4	Ac32 suY ⁺ try ⁻	try ⁺	ace	63/117	54%
HfrC1 try ⁺	Ac32 su3 try ⁻	try ⁺	ace	50/108	46%
HfrC1 try ⁺	Ac32 su3 try ⁻ ø80 ⁺	try ⁺	ace	133/292	44%
H12 su3 try ⁺	Ac32 try ⁻	try ⁺	ace	143/273	52%
HfrC1 try ⁺	Ac32 su3 try ⁻	try ⁺	ace	275/621	44,3%
UV95 UDPG ⁻ try ⁺	H12 su3 try ⁻	try ⁺	gal	145/279	52%
		gal ⁻	pho	0/145	100%
HfrC1 try ⁺	Ac32 su3 try ⁻	try ⁺	ace	139/246	56%
HfrC1 try ⁺	Ac32 su3 try ⁻ ø80 ⁺	try ⁺	ace	156/325	48%

Tabelle 10. Kopplungsanalyse der Suppressoren su3, suY und su9D.

SM = selektives Merkmal, NSM = nicht selektives Merkmal, NSM⁺/SM⁺ = Anteil der NSM⁺-Kolonien an den SM⁺-Kolonien. Cys = Cystein, try = Tryptophan, ace = Acetat, UDPG = Gen der Uridindiphosphatglucose-Phosphorylase, pho = alkalische Phosphatase.

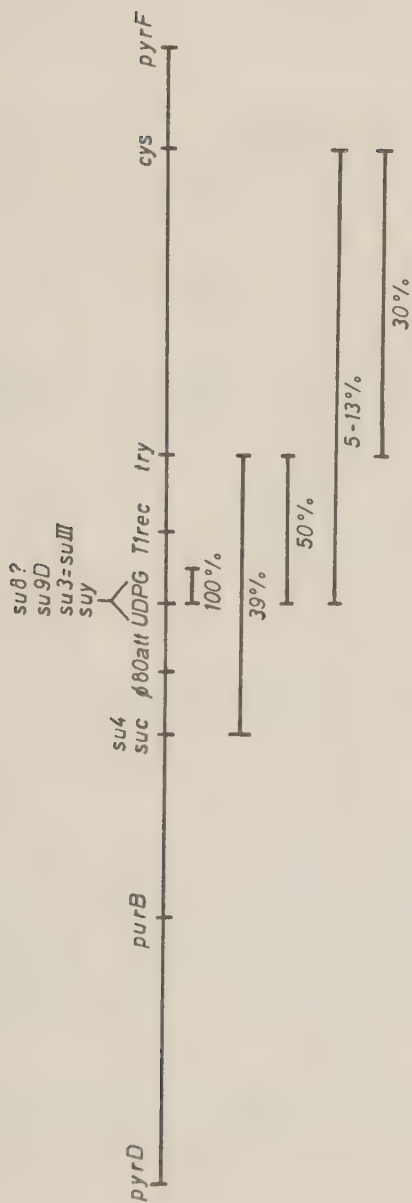


Abb.14

suY transduziert werden. Es ist also äußerst wahrscheinlich, daß suY zwanglos aus suY⁻ durch eine Punktmutation erhaltbar ist.

Während Stämme, die einen oc-Suppressor tragen, oft verlängerte Generationszeiten aufweisen, ist das bei den hier untersuchten (wie bei anderen) am-Suppressoren suY und suID nicht der Fall (Tabelle 9). In Vollmedien liegen die Generationszeiten zwischen 27 und 52 min., je nachdem, ob die Zelle für den Phagen P1 lysogen ist oder nicht (Ursache nicht geklärt), in Minimalmedien, abhängig vom benutzten Stamm, aber nicht vom Suppressor, zwischen 48 und 75 min.

Wie bereits im Abschnitt über die Isolierung von Suppressoren kurz erwähnt, sind die hier behandelten Suppressoren alle in der Nähe des try-Operons lokalisiert. Bei der bemerkenswerten Anzahl von Suppressoren in dieser Gegend stellt sich die Frage nach ihrer Identität. Es waren bisher suIII und su c (Signer et al., 1965, Brenner et al., 1965 a), su3 und su4 (Garen et al., 1965, Weigert et al., 1967 b) sowie su8 und suY (Henning et al., 1964 c, 1965 b) beschrieben worden. SuIII von Brenner und su3 von Garen sind offenbar die gleichen Suppressoren, da beide das gleiche Suppressionsmuster für T4 am-Mutanten, die gleiche Kopplung mit try haben und beide Tyrosin einbauen (Kaplan et al., 1965, Weigert et al., 1965 b, Signer et al., 1965, Garen et al., 1965). Su c und su4 sind oc-Suppressoren, die ebenfalls gleich sind (Brenner et al., 1966, Weigert et al., 1967 a): Sie spezifizieren Tyrosin (Weigert et al., 1967 b) und sind zu 50 % mit try gekoppelt (Brenner et al., 1966). Su8 ist ebenfalls zu 50 - 70 % mit try ko-transduzierbar (Henning, 1964 c), hat aber ein von su c differierendes Suppressionsmuster für T4rII oc-Mutanten (Tabelle 3), was aber unter Umständen auf Stammverschiedenheiten zurückzuführen sein könnte (Brenner et al., 1966).

Kopplungsanalysen der Suppressoren su3, suY und su9D, die sich, wie schon ausgeführt, in ihrem Suppressionsmuster nicht unterscheiden lassen, fassen Tabelle 10 und Abb.14 zusammen.

Donor	Rezipient	SM	NSM	NSM ⁺ /SM ⁺	Kopplung
Ac32 su1D try ⁺	Ac63 try ⁻	try ⁺	am*	15/30	50%
HfrC1 try ⁺	Ac32 su1D	try ⁺	ace	17/285	6%
				264/275	96%
Ac32 su1D try ⁺	Ac32 try ⁻	try ⁺	ace	30/153	19%
				35/109	32%
				73/290	25%
Ac32 su1D try ⁺	Ac32 try ⁻	try ⁺	ace	225/1155	19,5%
Ac32 su1D try ⁺ cys ⁺	Ac32 cys ⁻	cys ⁺	ace	0/390	0
Ac32 su1D try ⁺	Ac63 try ⁻	try ⁺	ace	55/366	15%
Ac32 su1D try ⁺	Ac123 try ⁻	try ⁺	ace	27/414	5%

Tabelle 11. Kopplungsanalyse des Suppressors su1D

Bezeichnungen wie in Tabelle 10.

* 30 try⁺ Isolate wurden mit T4 am N52 und am BH23 auf Permissivität getestet.

Die Kopplung mit dem UDPG-Merkmal (Abb.14) ist in allen Fällen 100 %, die Kopplung von suY und su3 mit try ist 50 %, sei es, daß man den Suppressor in die Zelle transduziert, oder ihn mit try⁺ als selektivem Merkmal entfernt. Das Vorhandensein des ϕ 80dtsuY, der sowohl den Suppressor suY, als auch das UDPG-Gen und einen Teil des try-Operons trägt, legt eigentlich schon die Lokalisation des suY zwischen ϕ 80att und try fest. Um jedoch vollständig auszuschließen, daß suY bzw. su3 zur Linken von ϕ 80att liegen, wurden die gleichen Kopplungsanalysen mit ϕ 80-lysogenen Zellen gemacht. Signer konnte nämlich zeigen (Signer, 1965), daß z.B. su c und try in ϕ 80 sensitiven Zellen zu 39 % gekoppelt sind, während in ϕ 80-lysogenen Zellen nur eine Kopplung von 0,3 % festgestellt wird (Abb.14). Das Fehlen einer solchen Spreizung durch Insertion des Prophagen zeigt einwandfrei, daß suY und su3 zur Linken des ϕ 80 att liegen. Zusammenfassend aus den Kartierungsdaten läßt sich daher sagen, daß vermutlich su3, suY und su9D identisch sind, sie liegen zur Rechten des ϕ 80att und ganz nahe am UDPG-Merkmal (Abb.14).

Unerwartete und unüberwindliche Schwierigkeiten ergaben sich bei den Versuchen, die genaue Lokalisierung des Suppressors su1D festzulegen. In Anbetracht der außerordentlich schwankenden Kopplungsdaten von 0 - 96 % trat der Verdacht auf, daß neben der Kopplung noch andere physiologische Effekte bei den Transduktionen eine Rolle spielen. (Tab.11)

Am Rande sei erwähnt, daß vor Kenntnis dieser Schwierigkeiten mit Hilfe von Dreifaktorkreuzungen versucht wurde, die relative Lage von su3, suY und su1D festzulegen. Als Außenmerkmal wurde try (SM) benutzt und unter den try⁺ Transduktanten nach su⁻ Rekombinanten (NSM) gesucht, die, weil der Rezipient eine ace-am-Mutante war, als ace⁻-Clone zu erkennen waren. Nachdem zunächst die Replikaplaten ohne Acetat den Anschein gaben, als ob bei allen möglichen Kreuzungs-Kombinationen dieser 3 Suppressoren su⁻-Rekombinanten in vernünftiger Anzahl (ca. 10 %) auftreten, starben etwa 70 % der

su⁻-Kolonien beim Versuch, sie zu isolieren. Die übrigen wuchsen außerordentlich schlecht, waren su⁺ für T4 am N52 und am B17, supprimierten aber den hier verwendeten Ao32 nicht. Diese gänzlich unverstandenen Ergebnisse lassen daran denken, daß Rekombination in, oder in der Nähe von Suppressorgen solche Effekte hervorrufen kann, die leicht zu Fehlinterpretationen von Suppressorkartierungs-Daten führen können. Genau die gleichen Beobachtungen hat kürzlich auch Beckwith gemacht (pers.Mitt.). Die Auswertung der Kopplungsanalyse läßt diese Effekte zahlenmäßig nicht ins Gewicht fallen. Das Verhalten des suID ist aber hierdurch nicht zu erklären (vgl. auch Apirion, 1966).

B) Eigenschaften von su⁻ Reversionen.

Das ungewöhnliche Verhalten des suID-Alleles bei den Lokalisierungsversuchen hatte nahe gelegt, daß der Suppressionsmechanismus hier ein anderer sein könne als z.B. im Fall des Allels suY. Die bereits gestellte Frage nach der Verantwortlichkeit des Suppressorgen-Produktes für die unterschiedliche Supprimierbarkeit verschiedener am-Orte im Decarboxylase-Gen (Abschnitt 2bd) führte zu Versuchen, näheres über den Mechanismus der Suppression durch den am-Suppressor suID zu erfahren. Zu dieser Zeit lagen einige Berichte über "nonsense"- und "missense"-Suppressoren vor (Apirion, 1966, Reid et al., 1965, Bollen u. Herzog, 1966), die Anhaltspunkte dafür gaben, daß bei den entsprechenden Suppressionsmechanismen Veränderungen an Ribosomen, speziell ribosomalen Proteinen beteiligt sein könnten. Die hypothetische Beteiligung eines Proteins als primärem Suppressorgen-Produkt gab im Gegensatz zur Alternative, nämlich einer Nukleinsäure als primärem Gen-Produkt, genetische Untersuchungsmöglichkeiten in die Hand. Bei su⁻-Selektionen eines solchen Suppressors sollten für Proteine charakteristische Mutationstypen auftreten. Zu erwarten wären 1.) temperaturempfindliche Suppressoren und 2.) am-Mutationen in dem Suppressorgen. Im Fall 2) sollte die spezifische Funktion des Suppressors durch einen anderen Suppressor wieder angestellt werden.

Behandlung	Wurfgrößen	
	amN52	T4D ⁺
22°C → 22°C	58	80
22°C → 40°C	9,2	90
22°C → 40°C (10') → 22°C	50	67
40°C → 40°C	6,7	111
40°C → 22°C	34,3	100

Tabelle 12. Temperaturempfindlichkeit des Suppressors su1D50

Die Kulturen wurden bei 22°C bzw. 40°C in vollmedium bis zu einem Titer von 2×10^8 Zellen/ml gezüchtet, dann auf 40°C bzw. 22°C gebracht und sofort mit T4D⁺ und T4 am N52 (Multiplizität = 0.5) infiziert und 6 min (bei 40°C) bzw. 10 min (bei 22°C) adsorbiert. Freie Phagen wurden durch Zugabe von Antiserum entfernt, die Zellen 10^{-4} -fach verdünnt und nach 60 min (bei 42°C) bzw. 180 min (bei 22°C) mit Chloroform lysiert. Die Phagen wurden auf CR 63 titriert.

→ Die Richtung der Pfeile gibt die vorgenommene Temperaturänderung an.

Zu diesem Zweck wurde der Stamm Ac32 *suID* mit Diäthylsulfat mutagenisiert (Champe u. Benzer, 1961) und entweder einer Penicillin-Selektion für Acetat-Auxotrophie unterworfen, oder direkt für fehlende Permissivität für T4 am-Mutanten selektioniert (Champe u. Benzer 1961). Bei der Penicillinselektion bei 37°C fand sich die Mutante Ac32 *suID*⁻⁵⁰, in der der am-Suppressor extrem temperaturempfindlich geworden war. Der Stamm erwies sich als *ace*⁺ und permissiv für T4 am-Mutanten bei 22°C, aber *ace*⁻ und nicht permissiv für T4 am-Mutanten bei Temperaturen über 30°C. Zwei weitere Mutanten wurden nach der anderen Selektionstechnik gefunden: Ac32 *suID*⁻¹⁴ und Ac32 *suID*⁻²¹. Beide Mutanten sind *su*⁻, d.h., sie supprimieren weder die am-Mutation Ac32 noch sind sie permissiv für T4 am-Mutanten. Doch zeigt sich ein bemerkenswerter Unterschied: Lysogenisiert man Ac32 *suID*⁻²¹ mit ϕ 80*dsuY*, so werden die T4 am B17, am BH23 und am BH230 nicht bzw. schlecht supprimiert, d.h. die *suID*-Funktion wird nicht angestellt. Der Stamm Ac32 *suID*⁻¹⁴ ϕ 80 ϕ 80*dsuY* supprimiert jedoch die T4 am B17, am BH23 und am BH230 sehr gut, d.h. die durch Mutation verlorengegangene *suID*-Funktion taucht in Gegenwart des *suY*-Alleles wieder auf.

1) Eigenschaften von Ac32 *suID*⁻⁵⁰

Als erstes waren die drei Möglichkeiten der Temperaturempfindlichkeit dieses Suppressors zu prüfen. Handelt es sich um eine Temperatur-empfindliche Synthese des Produktes, um eine Temperatur-empfindliche Funktion desselben oder um ein Produkt, das bei erhöhter Temperatur irreversibel inaktiviert wird? Zur Prüfung dieser drei Möglichkeiten wurden die Zellen bei verschiedenen Temperaturen gezogen und dann entsprechenden Temperaturveränderungen unterworfen. Auf diesen so behandelten Zellen wurden die Wurfgrößen von T4 am-Mutanten und T4-Wildtyp gemessen. Tabelle 12 zeigt das Ergebnis. Es ist offensichtlich, daß weder die Synthese des Produktes, noch das Produkt selbst, sondern allein seine Funktion durch Erhöhen der Temperatur beeinträchtigt wird.

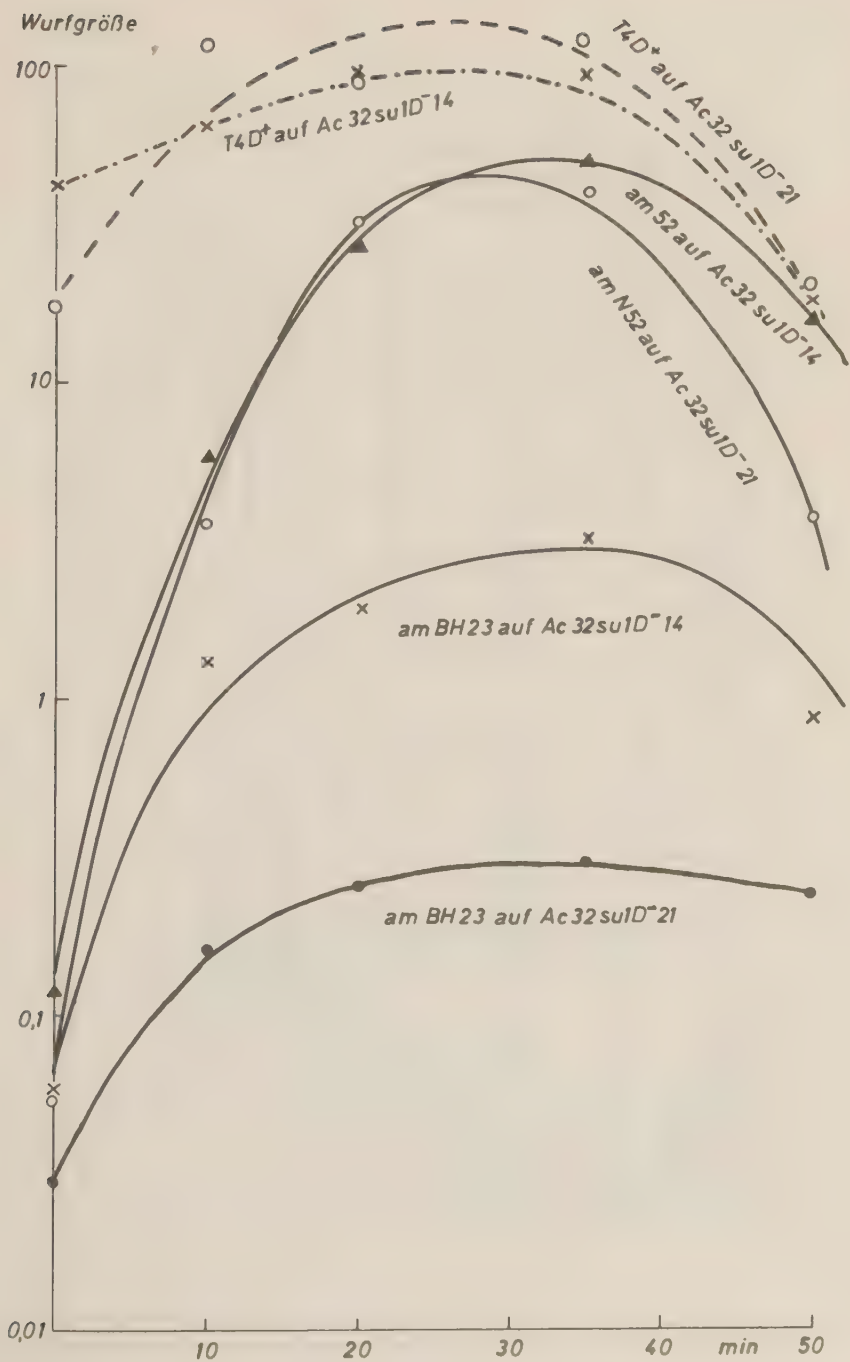
Lysogenisiert man den Stamm mit $\phi 80\text{dtsuY}$, so bleibt auch dann die suID -spezifische Funktion bei hoher Temperatur nicht erhalten. Bei Ac32 suID^{-50} handelt es sich also um einen Suppressor mit extrem Temperatur-empfindlicher Funktion. Dieses Verhalten ist für Proteine zwar nicht üblich, doch findet man die gleichen Verhältnisse bei dem Repressor des Phagen λ_{857} (Tomizawa u. Ogawa, 1967) und Mutationen im Struktur-Gen des aktivierenden Enzyms der Valin-t-RNS (Eidlic u. Neidhardt, 1965, Böck, pers.Mitt.).

Aufschlußreich und interessant für die Wirkungsweise des Suppressors suID sind die verschiedenen Reversionsmöglichkeiten von Ac32 suID^{-50} . Es wurden 3 Klassen mit etwa gleicher Häufigkeit gefunden:

- 1.) $\text{ace}^+ \text{suID}^+$ bei 42°C ;
- 2.) ace^+ bei 42°C , suID^- bei 42°C , suID^+ bei 22°C ;
- 3.) kein Wachstum bei 42°C , auch nicht auf Vollmedien.

Während Klasse 1) Temperatur-resistente suID -Reversionen sind, Klasse 2) offenbar ace^+ -Reversionen darstellt, ist Klasse 3) dadurch interessant, daß die Temperatur-empfindliche am-Suppression zu einer allgemeinen Temperatur-Empfindlichkeit der Zellen geworden ist (vgl. Apirion, 1966). Diese Dissoziation beider Eigenschaften, Temperatur-Empfindlichkeit und Suppression ist dann nicht ganz unverständlich, wenn man in Betracht zieht, daß der Suppressionsmechanismus an der Peptid-synthetisierenden Maschinerie eingreifen muß. Für die Hypothese der Beteiligung der Ribosomen an der Suppression wären in dieser Klasse Zellen mit Temperatur-empfindlichen Ribosomen zu erwarten.

Wichtig für die ganze Betrachtung wäre die Lokalisation der Mutante Ac32 suID^{-50} . Ebenso wie bei dem Ausgangsstamm Ac32 suID schlugen jedoch alle Kartierungsversuche fehl. Doch konnte die Temperatur-Empfindlichkeit - und das ist im Zusammenhang mit den oben diskutierten Reversionen wichtig - try-gekoppelt in den Stamm Ac32 suID transduziert werden. Es traten mit etwa 25 % Kopplung Clone mit Temperatur-empfind-



Zeit nach In- fektion mit $\phi 80$ tsuY	T4 Phagen-Würfe pro infizierter Zelle								
	in Ac32su ⁻		in su1D ⁻ 14		in su1D ⁻ 21				
	T4D ⁺ amN52 amBH23		T4D ⁺ amN52 amBH23		T4D ⁺ amN52 amBH23				
0 min	140	0.07	0.01	95	3	0.1	115	0.8	0.01
7 min	180	1.8	0.01	85	12	2.8	100	3.7	0.01
30 min	150	20	0.1	150	95	8.6	125	50	0.08
7 min (+CM)	180	2.3	0.13	150	22	7.5	100	4.6	0.1
30 min (+CM)	200	41	0.1	195	66	17	85	28	0.1

Tabelle 13. Kooperation verschiedener suD-Allele mit suY

Der Versuch wurde wie in der Legende zu Abb.7 durchgeführt.

In den Proben "+CM" waren von t=3 min nach $\phi 80$ -Infektion bis zur Verdünnung der Komplexe 0.25 mg/ml Chloramphenicol anwesend.

Stamm	Generationszeiten		Spez. Akt.
	Vollmedium	Minimalmedium	
Ac32su1D ⁻ 50	30 min	66 min	6 (22°C)
Ac32su1D ⁻ 50ø80,ø80dtsuY	-	-	18 (37°C)
Ac32su1D ⁻ 14	30 min	76 min	0
Ac32su1D ⁻ 14ø80,ø80dtsuY	-	-	20
Ac32 su1D ⁻ 21	50 min	157 min	0
Ac32su1D ⁻ 21ø80,ø80dtsuY	-	-	20

Tabelle 14. Generationszeiten und spezifische Aktivitäten der su1D⁻ Derivate

lichem ace^- -Merkmal auf. Doch zeigten sie keine temperaturabhängige T4 am-Suppression , d.h. sie waren entweder su^+ bei 42°C oder su^- bei 22°C und 42°C (für T4 am N52 und am BH23). Diesen undurchsichtigen Phänomenen wurde nicht weiter nachgegangen.

11) Eigenschaften von Ac32 suID^{-14} und Ac32 suID^{-21}

Zur Demonstration des Anstellens der suID -Funktion zeigt Abb.15 Kinetiken eines Infektionsexperimentes. Das rasche Erscheinen der Suppressoraktivität für T4 am N52 zeigt das Wirksamwerden des Suppressors suY in den beiden Stämmen Ac32 suID^{-14} und Ac32 suID^{-21} . Das Ansteigen der Suppression für den nur vom Suppressor suID supprimierbaren T4 am BH23 im Stamm Ac32 suID^{-14} im Gegensatz zu dem um eine Zehnerpotenz schwächeren Anstieg der Suppression im Stamm Ac32 suID^{-21} demonstriert den spezifischen Anstelleffekt. Unter der so gestützten Annahme, daß das suID -Produkt ein Protein sein könnte, wurde ferner das Anstellen in Gegenwart von Chloramphenicol geprüft. In Tabelle 13 ist ein gleicher Versuch wie in Abb.15 aufgezeichnet, nur wurde parallel zu einem Teil der Inkubationsröhrchen 3 min. nach Infektion mit $\phi 80\text{dtsuY}$ 0.25 mg/ml Chloramphenicol gegeben. Es war jedoch weder ein Effekt auf die Ausprägung der suY -Funktion noch auf das Erscheinen der suID -spezifischen Suppression festzustellen.

Abgesehen davon, daß alle drei su^- -Derivate des suID mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit wieder zu su^+ revertieren (um 10^{-5}), zeigen sie weiter kein ungewöhnliches Verhalten. Tabelle 14 faßt die Generationszeiten und spezifischen Aktivitäten der drei Stämme zusammen. Auch bei den Stämmen Ac32 suID^{-14} und Ac32 suID^{-21} schlugen, wie fast zu erwarten, alle Kartierungsversuche fehl.

Die am Anfang des Kapitels gestellte Frage nach der Art des suID -Suppressorgen-Produktes kann also dahingehend beantwortet werden, daß eine Nukleinsäure als primäres

Suppressorgen-Produkt unwahrscheinlich ist. Die extreme Temperatur-Empfindlichkeit, wie die Fähigkeit des suY , in einem su^- -Derivat des $suID$ die $suID$ -Funktion zu restaurieren, lassen viel eher an ein Protein denken. Offensichtlich ist hier das Ende der Aussagemöglichkeiten von allen in vivo-Versuchen erreicht. Weiterführen könnten nur Experimente zur Suppression in einem zellfreien System (z.B. Capecchi u. Gussin, 1965 oder Carbon et al., 1966). Dafür, wie zur sicheren Interpretation der Suppressionswirkung beider Suppressoren auf die $ace-am$ -Orte, ist die Kenntnis der von ihnen spezifizierten Aminosäuren unerlässlich.

γ) Aminosäure-Inkorporation durch den Suppressor suY

Hierfür bot sich das von Garen und Mitarbeitern entwickelte System der alkalischen Phosphatase an (Garen u. Siddiqi, 1961, Weigert et al., 1965 a b c). Benutzt wurde die am -Mutante H12 der alkalischen Phosphatase, die freundlicherweise von Dr. A. Garen zur Verfügung gestellt wurde. Abb.16 stellt einen "Fingerprint" der tryptischen Peptide des Wildtypproteins dar. Die Mutation H12 liegt in dem Lysinpeptid L1, das mit Peptid L2 zusammenläuft. Zur Isolierung von Wildtyp wie supprimiertem Enzym wurde zunächst im Stamm Hfr H (R_{try}^- , leu^- , try^-) nach der Methode von Echols et al. (1961) durch Selektion für Wachstum auf β -Glycerophosphat eine für die alkalische Phosphatase konstitutive Mutante gewonnen. Für das Mutantenenzym wurde von diesem Stamm eine F^- -Phänokopie (Bonhoeffer, 1966) hergestellt und die H12 Mutation aus dem Stamm HfrC H12 $su3$ leu -gekoppelt durch Konjugation in den Hfr H (R_{try}^- R_{2pho}^- , leu^- , try^-) gebracht. In diesen so erhaltenen Hfr H (R_{try}^- R_{2pho}^- , try^- , H12) wurde der Suppressor suY^+ try -gekoppelt transduziert. Glücklicherweise suppressierte er die H12-Mutante. Da dieser Stamm aber nur etwa 1/5 bis 1/10 soviel Enzym wie der Wildtyp produzierte, mußten Ansätze von je 60 l in Tris-Glukose-Medium aufgezogen werden, die nach der Methode von Malamy u. Horecker

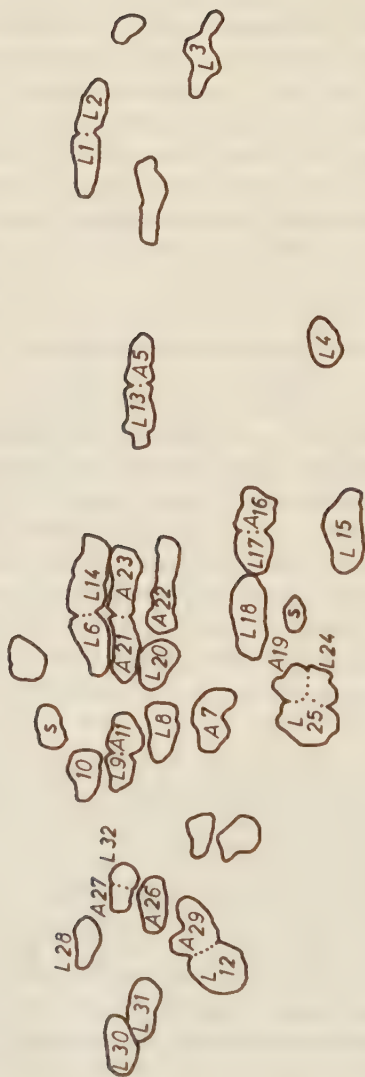


Abb. 16

I.) Wild:

	Leu	Lys	Ala	Gly	Tyr	Try
Peptid 1	1	0,98	-	1,49	-	+
Peptid 2	2	1,30	2,1	1,3	-	-

II.) suY:

	Leu	Lys	Ala	Gly	Tyr	Try
Peptid 1+2	3	1,98	2,25	2,24	0,835	-

Tabelle 15. Aminosäuresubstitution in Peptid L1 durch
Suppression der Mutante H12

Die Ergebnisse wurden auf die ermittelten Leucinwerte bezogen, die gleich 1, 2 oder 3 gesetzt wurden. Tryptophan wurde durch Anfärben mit Ehrlichs Reagenz auf dem Papier nachgewiesen. Im Falle des von suY supprimierten Peptids ließen sich Peptid 1 und Peptid 2 bei der pH 1,9-Elektrophorese nicht trennen und wurden daher gemeinsam analysiert.

(1964) protoplastiert wurden. Nach ein- oder zweimaliger Fraktionierung des Enzyms auf DEAE-Säulen wurde es mehrmals mit Ammonsulfat gefällt und aus etwa 60 % Ammonsulfat-Lösung kristallin erhalten (Malamy u. Horecker, 1964). Das kristalline Enzym hatte beim Wildtyp eine spezifische Aktivität von 4 000, bei dem supprimierten von nur 2 000. Der Vorschrift von Rothman u. Byrne (1963) folgend wurde das Enzym nach Dialyse gegen Wasser mit Aceton-Salzsäure gefällt und nach Reduktion und Carboxymethylierung 3 Std. mit Trypsin bei 37°C abgebaut. Elektrophoresen und Chromatographien wurden wie von Weigert et al. (1965 b) beschrieben ausgeführt. "Fingerprints" des supprimierten Enzyms unterschieden sich nicht von dem "Fingerprint" des Wildtyp-Enzyms, woraus sich schon schließen ließ, daß Aminosäuren wie Glutaminsäure, Glutamin, Lysin und Serin, die neben Leucin, Tryptophan und Tyrosin bei Änderung jeweils einer Base des am-Codons (UAG) zu erwarten wären, offenbar nicht eingebaut werden (Weigert et al., 1965 a). Aminosäureanalysen der durch erneute Papier-Elektrophorese weiter gereinigten Peptide zeigt Tabelle 15. Das Peptid L1 besteht aus 1 Leucin, 1 Lysin, 1 Glycin und es enthält (nach Färbung mit Ehrlichs Reagenz) Tryptophan. Das Peptid L2 besteht aus 2 Leucin, 1 Lysin, 2 Alanin und 1 Glycin. Analyse des supprimierten Enzyms zeigte, daß suY an Stelle des Tryptophans Tyrosin einbaut.

g) Aminosäure-Inkorporation durch den Suppressor suID

Das suID-Derivat des Stammes Hfr H ($R_{try}^- R_{2pho}^- try^- H12$) wurde in der gleichen Weise hergestellt wie das suY-Derivat. Auch suID supprimierte den am-Ort H12. Jedoch stellte sich heraus, daß die Menge des enzymatisch feststellbaren Enzyms sehr gering war (2 % des Wildtyps). Dies deutet darauf hin, daß eine vom suY verschiedene Aminosäure eingebaut wird, d.h. daß vielleicht der überwiegende Teil des Enzyms als inaktives Protein vorliegt. Weitere Versuche werden zeigen, ob dies zutrifft und ob sich dasselbe isolieren läßt, so daß Aminosäure-Analysen durchgeführt werden können.

Diskussion

Pleiotrope Mutationen im Strukturgen der Decarboxylase-Komponente des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes.

Die vorliegenden Daten zeigen, daß sich alle untersuchten pleiotropen Mutanten mit Ausnahme von Ac45 als am- oder oc-Mutanten charakterisieren lassen. Die Natur des Codons von Ac45 wurde nicht näher untersucht. Die Mißerfolge bei der Suppressorsuche und die Nichtrevertierbarkeit durch Aminopurin besagen noch nicht, daß es sich nicht etwa doch um eine "nonsense"-Mutation handeln könne, da die Umwandlung dieses Codons in ein anderes zu einem nicht funktionsfähigen Protein führen könnte. Natürlich könnte die Mutante genau so gut Folge einer Leserahmenverschiebung sein (Crick et al., 1961).

Die Mutation Ac45PRA führt zu einer Temperatur-empfindlichen Decarboxylase-Komponente. Sie ist hierdurch, wie auch durch die Reversionsstudien als in dem Strukturgen der Decarboxylase liegend charakterisiert. Da man Wildtyprekombinanten bei Kreuzungen zwischen Ac8 und Ac45PRA erhält, kann es sich bei dieser Reversion von Ac45 nicht um eine Deletion handeln, die größer als der Abstand Ac8 - Ac45PRA ist. Es ist somit bewiesen, daß die Reversion am Ort, oder sehr nahe am Ort Ac45 stattgefunden hat und somit die ursprüngliche O⁰-Typ-Mutation Ac45 im Strukturgen der Decarboxylase liegt. Da supprimierte "nonsense"-Mutanten ebenfalls defekte Decarboxylasen produzieren (Henning et al., 1966), kann daher geschlossen werden, daß Abbruch der Polypeptidsynthese im oben genannten Strukturgen die Synthese der Liponsäure-Reduktase-Transacetylase-Komponente entweder vollständig (Ac8, Ac32, Ac38) oder teilweise (Ac7, Ac13) hemmt.

Ähnliche Verhältnisse wurden auch in anderen Systemen gefunden. Von besonderem Interesse ist hier die Situation im lac- und try- Operon. Arbeiten von Katze et al. (1966) haben

gezeigt, daß die Richtung der Polypeptid-Synthese im lac-Operon mit der Richtung der Polarisierung (Beckwith, 1964 a, Newton et al., 1965) übereinstimmt. Für das try-Operon konnte die Syntheserichtung ebenfalls festgelegt werden (Yanofsky, 1963; Guest u. Yanofsky, 1966). Auch hier stimmt sie mit der Richtung der Polarisierung überein.

Es ist also offenbar die Regel, daß am- oder oc-Mutationen in Strukturgenen die Aktivität der in der Richtung der Proteinsynthese nachfolgenden Gene ganz oder partiell blockieren. Diese Beobachtungen haben in verschiedenen Systemen ausgedehnte Diskussionen erfahren (z.B.: lac-Operon: Newton et al., 1965; try-Operon: Yanofsky und Ito, 1966, 1967; his-Operon: Martin et al., 1966; gal-Operon: Starlinger et al., pers. Mitt.). Wie auf Seite 20 schon kurz angeschnitten, können für dieses Verhalten verschiedene Hypothesen aufgestellt werden: Entweder wird die m-RNS nach dem nonsense Codon gar nicht mehr oder mit sehr viel kleinerer Wahrscheinlichkeit gelesen, als vor dem nonsense Codon, oder es wird erst gar keine m-RNS synthetisiert. Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang die Hybridisierungsversuche von Contesse et al. (1966) mit $\phi 80$ lac und von Yanofsky und Imamoto (1966) mit $\phi 80$ d try. Für das lac-Operon konnte gezeigt werden, daß in vollinduzierten polarisierten am- oder oc-Mutanten weniger lac-spezifische m-RNS als im Wildtyp vorhanden ist. Das gleiche gilt für das try-Operon (Yanofsky und Imamoto, 1966). Die Menge synthetisierter m-RNS hängt offenbar von dem Abstand zwischen dem Mutationsort und dem Anfang des nächsten Cistrons ab, denn man findet um so mehr m-RNS, je weiter die Mutation im Strukturgen, besser, je näher sie an der nächsten Cistrongrenze liegt. Im lac-Operon können die O^0 -Typ-Mutanten zwanglos als extrem polarisierte "nonsense"-Mutanten aufgefaßt werden, da es alle Übergänge bis zum fast völligen Fehlen der Polarisierung gibt (Newton et al., 1965). In analoger Weise könnte man daher aus der Lage der O^0 -Typ-Mutanten und polarisierten Mutanten im Strukturgen der Decarboxylase auf die Richtung der Proteinsynthese schließen, d.h. die

Decarboxylase-Komponente sollte als erste produziert werden.

Beim Vergleich des Pyruvatdehydrogenase-Systems mit allen anderen fällt der große Anteil von O^0 -Typ-Mutanten auf (Henning et al., 1966). So wurden unter etwa 60 Mutanten 10 O^0 -Typ-Mutanten gefunden. Im lac-Operon wurden nur 2 Mutanten mit O^0 -Typ-Charakter unter einer sehr viel größeren Zahl (Newton et al., 1965) und im try-Operon gar keine isoliert (Yanofsky und Ito, 1966), wenn man die sehr stark polarisierten am- und oc-Mutanten im Gen der Anthranilsäuresynthetase (produzieren noch etwa 5 % voll induzierte Tryptophansynthetase) nicht als solche einstuft. Die Frage bleibt daher offen, ob die hier behandelten O^0 -Typ-Mutanten als extrem polarisierte Mutanten analog denen des lac-Operons, oder aber als Regulationsmutanten im Strukturgen der Decarboxylase aufzufassen sind. Wäre dem so, dann ließen sich die C-Gen-Mutanten des Arabinose-Gen-Komplexes als gewisse Analoga betrachten (Englesberg et al., 1965). Man müßte dazu z.B. annehmen, daß die Pyruvatdehydrogenase einer positiven Regulation dergestalt unterliegt, daß neben dem Pyruvat die Decarboxylase oder ein Teil derselben zur Induktion notwendig ist (Henning et al., 1966). Ungeachtet dessen ist das Ergebnis dieses Teiles der Untersuchungen eindeutig: O^0 -Typ und polarisierte Mutanten sind mit einer möglichen Ausnahme nonsense Mutanten und liegen im Strukturgen der Decarboxylase-Komponente.

Wirkung von am-Suppressoren auf die Synthese der Pyruvatdehydrogenase

Die Isolierung des $\phi 80dtsuY$ erbrachte die Möglichkeit, die Wirkung eines am-Suppressors auf die Synthese der Pyruvatdehydrogenase in O^0 -Typ-Mutanten zu studieren. Die entsprechenden Infektionsexperimente z.B. mit dem Stamm Ac32 (O^0 -Typ), brachten ein unerwartetes Ergebnis: Erst 30 - 40 min. nach Infektion mit $\phi 80dtsuY$ war Pyruvatdehydrogenase-Aktivität festzustellen. Das Wirksamwerden der T4 am-Suppression dagegen kann bereits nach 2 min. beobachtet werden. Selbst wenn

man annimmt, daß das Suppressorgen-Produkt noch nach der T4-Infektion weiter synthetisiert wird, d.h. während der 20 min. der Latenzzeit, verbleibt noch eine erhebliche Zeitdifferenz zwischen Erscheinen der Pyruvatdehydrogenase und der T4 am-Suppression. Ebenso merkwürdig ist die Verzögerung bei der Suppression des T4 am B17. Es wäre denkbar, daß das späte Erscheinen der Pyruvatdehydrogenase auf den stark polaren Charakter von Ac32 oder auf einen vorher ablaufenden Induktionsprozeß zurückführbar ist. Die gleichen Versuche wurden daher mit einer am-Mutante im Strukturgenen der Liponsäurereduktase-Transacetylase vorgenommen (Ac63). Da sich die gleiche Verzögerung zeigte, sind der polare Charakter oder das Fehlen von Decarboxylase für den hypothetischen Induktionsvorgang bei Ac32 nicht die gesuchte Ursache. Im übrigen zeigt sich das gleiche Phänomen, wenn man nach Infektion mit ϕ 80dtsuY in einer O^0 -Typ-Mutante des lac-Operons das Erscheinen der β -Galaktosidase mißt (Smith et al., 1966). Die zeitlich genaue Analyse der Kinetik des Erscheinens der Pyruvatdehydrogenase mit solchen Infektionsexperimenten oder aber mit den Versuchen, die durch Änderung der Temperatur (von 40^0 auf 22^0C) in der Mutante Ac32 su1D⁻50 zum "Anstellen" der am-Suppression führten, hat kein sequentielles Erscheinen der Enzyme des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes demonstrieren können. Es konnte ausgeschlossen werden, daß mehr als 12 Moleküle Decarboxylase pro Zelle (d.h. 1 Gesamtkomplex-Äquivalent) bei 22^0C früher als 2 min. vor dem Erscheinen des Gesamtkomplexes vorhanden sind. Es gibt also keine größeren "pools" von Teilenzymen über einen längeren Zeitraum, aus denen dann der Gesamtkomplex zusammengesetzt wird. Ganz offenbar erfolgt die Bildung des Komplexes sofort nach Synthese je eines Teilenzym-Äquivalentes.

In diesem Zusammenhang ist wichtig, daß in anderen Systemen nach Induktion oder Derepression sehr wohl ein sequentielles Erscheinen der Enzyme eines Operons demonstriert werden konnte. Dies gilt für das his-Operon (Goldberger und

Berberich, 1965), das lac-Operon (Alpers und Tomkins, 1965/66) und das gal-Operon (Michaelis, pers.Mitt.).

Nach Arbeiten von Kaplan et al. (1965) sowie von Garen et al. (1965) ist der Wirkungsgrad von verschiedenen am-Suppressoren auf eine am-Mutante unterschiedlich. Für suI wurde 63 %, für suII 30 % und für suIII 51 % Translation der am Mutante H36 im Kopfprotein von T4 gemessen (Kaplan et al., 1965). Yanofsky und Ito (1966) haben für suI zeigen können, daß das Aufheben der Polarität in etwa der Menge an supprimiertem Enzym parallel geht. Die phänotypische nicht-Supprimierbarkeit einer am-Mutation ist unter der Annahme nur eines am-Codons (wogegen es keinerlei Hinweise gibt) dadurch leicht zu erklären, daß eine mit der Funktion des Proteins nicht vereinbare Aminosäure eingebaut wird, also eine "nonsense" zu "missense"-Suppression erfolgt. In diesem Falle sollte kreuzreagierendes Material dieses Enzyms und die Aufhebung des polaren Effektes dieser Mutation festzustellen sein. Im Falle der "Suppression" der Mutanten Ac32 und Ac38 durch den Suppressor su2 wird aber weder die Polarität aufgehoben noch erscheint eine immunologisch nachweisbare enzymatisch inaktive Decarboxylase-Komponente. Dieses Phänomen läßt an zwei Erklärungsmöglichkeiten denken:

- 1.) Die Nachbarschaft des am-Codons könnte einen Einfluß auf die Supprimierbarkeit haben, dergestalt, daß gewisse Basen oder Basenfolgen mit dem Suppressionsmechanismus interferieren oder
- 2.) es erfolgt eine "nonsense" zu "missense" Suppression. Die Decarboxylase-Komponente ist dann also defekt, funktioniert nicht beim Induktionsmechanismus (wie oben diskutiert) der Pyruvatdehydrogenase und ist, da sie dann auch nicht in meßbaren Mengen produziert wird, immunologisch nicht nachweisbar. Die Möglichkeit 2) ist die wahrscheinlichere, zumal sich andere Suppressoren (wie z.B. suI) in der Aufhebung der Polarisierung bei einigen am-Mutanten als äußerst wenig wirksam erwiesen (Henning, unveröff.).

Eigenschaften der am-Suppressoren

Die Kartierungen von suY und su3 und su9D haben die Lokalisation der Mutationsorte dieser drei Isolate an der gleichen Stelle, nämlich zur Rechten der Anheftungsstelle (s. Abb.1) des Phagen ϕ 80 nahe am UDPG-Gen sehr wahrscheinlich gemacht. Die merkwürdigen Eigenschaften, also schlechtes Wachstum oder Absterben der aus den Dreifaktorkreuzung (s. Seite 31) hervorgegangenen Rekombinanten sind unerklärt. Es wäre möglich, daß Rekombination in der Nähe von oder in Suppressorgenen mit irgendwelchen lebenswichtigen Funktionen interferiert. Da man bei der Kopplungsanalyse mit wesentlich größeren Zahlen von Rekombinanten arbeitet, dürften let/ale übersehen werden, sie fallen bei der Auswertung zahlenmäßig nicht so ins Gewicht. Allerdings läßt sich eben deswegen die Unmöglichkeit, den Suppressor su1D zu kartieren, nicht mit den genannten Phänomenen erklären. Eine merkwürdige Beobachtung bleibt jedoch bestehen: Trotz mehrerer Versuche (Beckwith, pers. Mitt., Smith et al., 1966) ist es nicht gelungen, einen ϕ 80dsuIII zu isolieren, d.h. einen ϕ 80, der das try-Operon und den Suppressor suIII* trägt, sondern nur einen ϕ 80dsuIII. Doch ist zu bedenken, daß bei den hier beschriebenen Kartierungsversuchen nicht suIII sondern der von Garen isolierte su3 benutzt wurde. Beide gleichen sich aber in allen bisher bekannten Eigenschaften: Lokalisation am try-Operon, Aminosäure-Einbau und Suppressionsmuster.

Ein weiterer Beweis dafür, daß suY und su3 offenbar identisch sind, ist die Tyrosin-Inkorporation unter der Wirkung von suY. Für su1D konnte nach vorläufigen Versuchen wahrscheinlich gemacht werden, daß dieser nicht Tyrosin spezifiziert.

* Mit römischen Zahlen werden die von Brenner isolierten am-Suppressoren bezeichnet und mit arabischen Zahlen die von Garen isolierten. Sie gleichen sich in allen bekannten Eigenschaften. Also suI = su1, suII = su2, suIII = su3.

Wirkungsweise der am-Suppressoren

Arbeiten von Capecchi und Gussin (1965) haben gezeigt, daß bei der Suppression durch den Suppressor *suI* eine Serin-t-RNS beteiligt ist. Ebenso haben Smith et al. (1966) wahrscheinlich machen können, daß bei der Suppression durch *suIII* eine t-RNS beteiligt ist. Diese Beobachtungen haben zu der Auffassung geführt, daß die Mutation von su^- zu su^+ zu einer Substitution einer Base des Anticodons der t-RNS führt (z.B. Smith et al., 1966). Die vorliegenden Daten für den Suppressor *suY* stehen mit einer solchen Interpretation nicht im Widerspruch, ohne sie weitergehend zu stützen. Die Isolierung des $\phi 80dtsuY$ zeigt, daß suY^+ über suY^- dominant ist. Für den Suppressor *suI* gilt nach den in vitro-Versuchen von Capecchi und Gussin das gleiche; auch ließ sich dies mit Hilfe eines F'gal $suII^+$ von Beckwith und Brenner (1965) für diesen Suppressor demonstrieren.

Der Suppressor *suY* wirkt auch in Zellen, die bereits einen Suppressor tragen (z.B. *suII* oder *suID*). Im suY^+suY^- -Heterogenoten findet man zwar durchweg die höchsten spezifischen Aktivitäten des supprimierten Enzyms, doch ist das kaum als echter Gen-Dosis-Effekt zu interpretieren, weil die Effekte viel zu gering sind. SuY^+suY^- -Heterogenoten produzieren weniger Enzym (Faktor: 0.5 - 0.75) als für suY^+ haploide Stämme. Es ist unbekannt, ob das auf eine Konkurrenz von suY^- und suY^+ Produkt zurückzuführen ist, oder auf eine schlechtere Ausprägung des Suppressors auf dem $\phi 80dtsuY$. Das letztere ist wahrscheinlicher, da hier nicht beschriebene Infektionsexperimente $\phi 80$ lysogener Stämme (*Ac32* $\phi 80^+$) mit $\phi 80dtsuY$ -Lysaten eine schlechte Ausprägung der Suppression zeigten.

Die Hypothese der Veränderung des Anticodons der suppressierenden t-RNS kann jedoch verschiedene Beobachtungen nicht erklären. Zunächst fallen die meist hohen Mutations-Häufigkeiten von su^- zu su^+ (oft $>10^{-4}$) auf. Auch ist zu bedenken,

daß t-RNS nach der Transcription in vielfacher Weise modifiziert wird (z.B. Holley et al., 1965, Zachau et al., 1966), daß weiter diese Modifizierung, speziell die Methylierung, einen Einfluß auf die Spezifität haben kann (Peterkofsky, 1964). Der Beweis der Anticodon-Hypothese bleibt aber ohnehin der Analyse der t-RNS vorbehalten. Bollen und Herzog (1966) haben für den Suppressor suII und Reid et al. (1965) für einen oc-Suppressor zeigen wollen, daß die Mutation von su⁻ zu su⁺ eine Veränderung der Ribosomen zur Folge hat. Diese Ergebnisse sind allein vom technischen her noch nicht als beweisend anzusehen, aber nicht ganz von der Hand zu weisen.

Von diesen Beobachtungen ausgehend wurden die Versuche mit den verschiedenen suID⁻-Derivaten gemacht. Die extreme Temperaturempfindlichkeit des suID⁻50 scheint für eine t-RNS eine sehr ungewöhnliche Eigenschaft darzustellen. Im Hinblick auf die Beobachtung Aprions (1966), der bei einer Temperatur-empfindlichen "missense"-Suppression die Beteiligung Temperatur-empfindlicher Ribosomen feststellen konnte, wurde auch hier an die Funktion von Ribosomen bei der Suppression gedacht. Man würde dann annehmen, daß die suID⁺-Mutation eine ribosomale Komponente in der Art verändert hat, daß mit Hilfe einer "per se" nicht supprimierenden t-RNS nunmehr das UAG-Codon gelesen wird. Im Falle des suID⁻50 wäre diese Wechselwirkung Temperatur-empfindlich, im Fall des suID⁻21 ist sie wieder verloren gegangen und bei der Mutante suID⁻14 ist die genannte Fähigkeit zur Wechselwirkung ebenfalls verloren gegangen, das Ribosom kann jedoch (und das offenbar "suID"-spezifisch) mit Hilfe der suY-t-RNS supprimieren. Ein solches Modell würde besagen, daß das Ribosom bei der Auswahl der zu inkorporierenden Aminosäure eine Rolle spielen kann. Es liegt auf der Hand, daß hier das Ende der Aussagemöglichkeit von "in vivo"-Versuchen erreicht ist.

Aus den Versuchen kann geschlossen werden, daß su9D, su3 und suY mit hoher Wahrscheinlichkeit identisch und verschieden von suID sind. Die Daten stehen nicht im Widerspruch mit der

Annahme, daß der Suppressor suY bzw. su3 eine t-RNS spezifiziert, das Verhalten des Suppressors su1D spricht jedoch gegen einen Suppressionsmechanismus dieser Art. Geplante in vitro-Versuche werden zeigen, inwieweit sich diese Annahme bestätigen läßt.

Zusammenfassung

- 1.) Es wurde der eindeutige Nachweis geführt, daß Mutanten, die die Synthese aller Komponenten des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes blockieren, im Strukturgen der Decarboxylase-Komponente des Komplexes liegen, da die Reversion solcher pleiotroper Mutanten eine temperaturlabile Decarboxylase produzieren können.
- 2.) Weiterhin ließ sich zeigen, daß die untersuchten Mutationsorte mit pleiotroper Wirkung mit einer Ausnahme "nonsense"-Mutationen darstellen, Mutationsorte also, die zum Abbruch der Polypeptidsynthese führen. Letzterer Nachweis wurde durch Isolierung von mehreren Suppressorgen-Mutanten und deren Charakterisierung als am- oder oc-Suppressoren geführt.
- 3.) Die Wirkung von am-Suppressoren auf die Synthese der Pyruvatdehydrogenase wurde untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein den Suppressor suY transduzierender Phage ϕ 80dtsuY isoliert. Mit diesem Phagen konnte durch Infektionsexperimente von am-Mutanten in der Pyruvatdehydrogenase gezeigt werden, daß die Einzelenzyme des Komplexes nicht sequentiell in einem Abstand von mehr als 2 min. bei 30°C erscheinen. Weiterhin konnte das Erscheinen der Suppression von T4 am-Mutanten nach Vorinfektion mit ϕ 80dtsuY gemessen werden. Es zeigte sich, daß die T4 am-Suppression wesentlich früher (ca. 2 min. nach ϕ 80dtsuY-Infektion) als die der Pyruvatdehydrogenase (ca. 30 min. nach Infektion) erscheint. Ein vorher ablaufender Induktionsmechanismus konnte als Ursache für das späte Auftreten der Pyruvatdehydrogenase ausgeschlossen werden.
- 4.) Es wurde domonstriert, daß es am-Suppressoren gibt, die nicht in der Lage sind, bestimmte am-Mutationen zu supprimieren. Weder ein defektes Protein noch die Auf-

hebung der Polarisierung konnte festgestellt werden. Es wird diskutiert, daß die Ursache dafür in der Unfähigkeit der defekten Enzymkomponente, an der Induktion des Enzymkomplexes teilzunehmen, liegen mag.

- 5.) Die Eigenschaften der verwendeten Suppressoren wurden näher untersucht. Es wurde durch genaue Kartierung und Aminosäureanalyse von supprimiertem Enzym gezeigt, daß suY, su9D und su3 mit hoher Wahrscheinlichkeit identisch sind: SuY und su3 spezifizieren beide Tyrosin. SuY, su9D und su3 liegen zwischen $\phi 80att$ und dem try-Operon, nahe dem UDPG-Gen. Su1D ist ein neuer, von allen bisher bekannten am-Suppressoren verschiedener Suppressor, der ebenfalls in der Gegend des try-Operons liegt und mit hoher Wahrscheinlichkeit eine von Tyrosin verschiedene Aminosäure einbaut.
- 6.) Reversionsstudien des Suppressors su1D machten unwahrscheinlich, daß dieser Suppressor durch eine im Anticodon veränderte t-RNS wirkt. Derivate dieses Suppressors sind entweder extrem Temperatur-empfindlich (bei Temperaturen über 22°C!) oder lassen sich durch einen anderen Suppressor wieder spezifisch anstellen. Die Beteiligung von Ribosomen an diesem Phänomen wird diskutiert.

Legenden zu den Abbildungen

Abb.1. Genkarte der Acetatregion. Die mit o versehenen Ziffern sind Mutanten, bei denen keine der Komponenten des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes auffindbar ist; die mit einem x versehenen sind "missense"-Mutationen im Decarboxylase-Gen; die mit einem P versehenen solche, die eine polarisierende Wirkung auf die Synthese des Restkomplexes haben und die mit einem . bezeichneten solche, die keine enzymatisch aktive Liponsäurereduktase-Transacetylase mehr synthetisieren. (Henning et al., 1964 a).

Abb.2a,b. Hitze-Inaktivierung verschiedener Pyruvatdehydrogenasen. In allen Fällen war die Proteinkonzentration 20 mg/ml in 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0. a.) Vergleich der Enzym-Inaktivierung in Extrakten der angegebenen Stämme (bei den angegebenen Temperaturen), die bei 30°C auf Glukose aerob gezogen waren. 100% entsprechen 280-300 Einheiten der Enzymaktivität pro ml der Extrakte. b.) Inaktivierung bei 50°C wie bei a.).

I.) und II.) Mischungen von Wildtyp- und Ac45PRA-Extrakten; I.) 75% Wildtyp- und 25% Ac45PRA-Enzym-Einheiten, II.) 40% Wildtyp- und 60% Ac45PRA-Enzym-Einheiten.

Abb.3. Hitzeinaktivierungen verschiedener Pyruvatdehydrogenasen. Die Proteinkonzentration war 20 mg/ml in 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0. 100% entsprechen 280-300 Enzymeinheiten. Die Stämme wurden in Minimalmedium mit Glukose bei 37°C aerob gewachsen. Inaktivierung von Ac45PRA Rev.3 und Rev.4 bei 42°C und 46°C und der beiden Wildtyprekombinanten Rek.1 und Rek.3 bei 50°C.

Abb.4. CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation eines HFT-Lysates. Das HFT-Lysat ϕ 80 ϕ 80dtsuY wurde wie in den Methoden beschrieben präpariert und 24 Std. bei 22000 U.p.M. zentrifugiert. Nach dem Austropfen wurde der "plaque"-Titer (P.T.) und der Transduktionstiter der angegebenen

Fractionen bestimmt und letzterer als Transduktions-Wahrscheinlichkeit (T.W.) (Methoden) aufgetragen. Die Fractionen wurden von links nach rechts mit fallender Dichte aufgetragen.

Abb.5. CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation des Lysates VIII $1^h \phi^{80}$ ϕ^{80} dsuY. Versuchsbedingungen wie in Abb.4.

Abb.6. Vermehrung von T4 am-Mutanten in HfrC nach Infektion mit ϕ^{80} dsuY. Der Test wurde in PB bei 37°C unter Belüftung durchgeführt. Zur Zeit $t = 0$ wurde HfrC₂ (log-Phase-Zellen bei 2×10^8 Zellen pro ml) mit VIII $1^h \phi^{80}$ ϕ^{80} dsuY (Multiplizität ca.5 für den lytischen Phagen) infiziert. Nach den verschiedenen hier angegebenen Zeiten wurde mit T4-am-Mutanten sowie T4 Wildtyp in Gegenwart von KCN (2×10^{-3} m) überinfiziert (Multiplizität = 0.3) und 7 min. adsorbiert. Anti-T4-Serum wurde zugegeben und nach 4 min. 10^{-4} fach verdünnt und weitere 40 min. inkubiert. Die Zellen wurden mit Chloroform lysiert und auf CR63 titriert.

⊕ ⊗ ⊙ ⊖ = Leerwerte ohne ϕ^{80} dsuY Infektion.

----- Anzahl der mit T4-Phagen infizierten Zellen.

Abb.7. Erscheinen der Pyruvatdehydrogenase in Ac32 nach Infektion mit ϕ^{80} ϕ^{80} dsuY. Der Stamm wurde in 1 l L-Bouillon bei 37°C bis zu einer Zelldichte von 10^9 Zellen/ml gezüchtet, abzentrifugiert und in 100 ml PB resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer Multiplizität von 10 (für den lytischen Phagen, bzw. 1 für den transduzierenden Phagen) infiziert und 15 min. bei 37°C in Anwesenheit von 0.01 m KCN inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 1 l vorgewärmter PB resuspendiert und bei 37°C unter Belüftung gehalten. Zu den angegebenen Zeiten wurden 100 ml-Proben entnommen und unter Zusatz von KCN (Endkonzentration 0.02 M) auf Eis geschüttet. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 0.1 M K-Phosphat-Puffer pH 7 beschallt und die spezifische Aktivität der Pyruvatdehydrogenase getestet (siehe Methoden).

Abb.8. Vergleich der Pyruvatdehydrogenase-Bildung mit der T4 am-Produktion in Ac32 nach Infektion mit $\phi 80 \phi 80\text{dtsuY}$ bei 30°C . Die Zellen wurden vorgewachsen und infiziert wie in der Legende zu Abb.7 ausgeführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und auf Enzym-Erscheinen und T4 am-Produktion getestet. T4 am-Mutanten und T4 Wildtyp wurden mit einer Multiplizität von 0.5 adsorbiert. Nach 5 min. wurden die Zellen 10^{-4} fach verdünnt und 20 min. in PB unter Belüftung inkubiert und dann durch Zugabe von Chloroform lysiert. Die Lysate wurden auf CR63 titriert. Der Titer ist in % des T4 Wildtyps angegeben. Die Vermehrung der Phagen wurde nicht durch Vorinfektion mit $\phi 80$ beeinflusst. Die Kurve "am N52 + Latenzperiode" ist die am N52 Kurve, die durch grafische Verschiebung um 25 min. erhalten wurde. Die spezifischen Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase wurden ebenfalls in % des voll supprimierten Ac32 suY aufgetragen.

Abb.9. Erscheinen der Pyruvatdehydrogenase im Stamm Ac63 nach Infektion mit $\phi 80 \phi 80\text{dtsuY}$. Versuchsbedingungen wie in Abb.7, jedoch wurde anstelle des Acetylphosphatstestes (siehe Methoden) mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat als Substrat das freigesetzte $^{14}\text{CO}_2$ gemessen. Ac63 ist eine am-Mutation in der Liponsäurereduktase-Transacetylase, die die Decarboxylase-Komponente mit einer spezifischen Aktivität von 60 produziert.

Abb.10. Erscheinen der Pyruvatdehydrogenase im Stamm Ac32 nach Infektion mit $\phi 80 \phi 80\text{dtsuY}$. Versuchsbedingungen wie in Abb.9. Abb.10: Erscheinen der Gesamtaktivität und Erscheinen der Decarboxylase-Komponente. Sie wurde durch Zusatz von 5 E Restkomplex pro Test gemessen. Die Decarboxylase erscheint zur gleichen Zeit wie die Gesamtaktivität.

Abb.11. Erscheinen der Pyruvatdehydrogenase im Stamm Ac32 suID⁻50 nach Temperatur-Änderung von 40°C auf 22°C . Die Zellen wurden unter Belüftung bei 40°C in Minimalmedium

mit Acetat bis zu einem Titer von 5×10^8 gezogen und zur Zeit 0 bei 22°C weitergezüchtet. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und die spezifische Aktivität mit dem Acetylphosphat-Test gemessen.

Abb.12. Ausverdünnen der Pyruvatdehydrogenase im Stamm Ac32 *suID*⁻⁵⁰ nach Abstellen des Suppressors durch Temperatur-Änderung. Die Zellen wurden bei 22°C in Minimalmedium mit Acetat bei 22°C unter Belüftung bis zu einem Titer von 5×10^8 Zellen/ml vorgewachsen und zur Zeit 0 bei 42°C weiterbelüftet. Die Kurve, die durch Zusatz von Restkomplex erhalten wurde, schließt die Temperaturinaktivierung des Restkomplexes aus.

Abb.13. Kinetik des Erscheinens von Gesamtkomplex und Decarboxylase im Stamm Ac32 *suID*⁻⁵⁰. Versuchsbedingungen wie in Abb.12 (Änderung der Temperatur von 40°C auf 22°C zur Zeit 0). Die Decarboxylase-Kurve wurde unter Zusatz von 5 E Restkomplex gemessen.

Abb.14. Genkarte der try-Region. (siehe auch Signer, 1966). Die Prozentzahlen geben die gefundenen Kopplungen der jeweiligen Merkmale an. T1 rec = Gen zur Synthese des T1 Receptors, $\phi 80$ att = Anheftungsstelle des Prophagen $\phi 80$, purB = Purin B, sonst wie Tabelle 10. Die Abstände sind nicht maßstabsgetreu gezeichnet.

Abb.15. Wirkung des Suppressors *suY* auf verschiedene *suID*⁻ Allele. Die Zellen wurden unter Belüftung in PB bei 37°C bis auf 2×10^8 Zellen/ml gezogen. Zur Zeit 0 wurde mit $\phi 80$ $\phi 80$ dt*suY* infiziert (Multiplizität = 5 für lytische Phagen, ca. 0.5 für transduzierende Phagen). Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen in Gegenwart von 2×10^{-3} m KCN mit T4 D⁺, am N52 und am BH23 überinfiziert (Multiplizität = 0.5). Nach 6 min. wurde Antiserum zugegeben, die Zellen 10^{-4} fach verdünnt und nach 45 min. mit Chloroform lysiert. Die Lysate wurden auf CR63 titriert.

Abb.16. Fingerprint der tryptischen Peptide der alkalischen Phosphatase. 5 mg tryptischer Peptide wurden als 15 mm langer Streifen aufgetragen und bei pH 4,7 elektrophoriert. Chromatografie wurde wie in den Methoden beschrieben ausgeführt. Die Bezeichnung L oder A heißt Lysin- oder Argininpeptid (nach Weigert et al., 1965), s=sehr schwach angefärbtes Peptid. Peptid 10 ist das C-terminale Peptid und die nicht bezeichneten Peptide sind vermutlich Verunreinigungen, da sie von Weigert et al. (1965) nicht beschrieben wurden.

Abkürzungen

PB = Penassay Broth
SM = selektives Merkmal
NSM = nicht selektives Merkmal
HFT = high frequency of transduction
T.W. = Transduktions-Wahrscheinlichkeit
P.T. = "plaque"-Titer
P.R. = partielle Revertante
SM^r = resistent gegen 200 γ /ml Streptomycin
SM^s = sensitiv gegen 200 γ /ml Streptomycin
t^s = Temperatur-sensitiv
UV = Ultraviolette Licht
IpM = Impulse pro Minute
UpM = Umdrehungen pro Minute
p.A. = "pro analysis"
Std. = Stunden
min. = Minuten
L = Lysin (-peptid)
A = Arginin (-peptid)
am = "amber"
oc = "ochre"
R = Regulatorgen
UDPG = Uridindiphosphatglukosephosphorylase
lac = Lactose
ara = Arabinose
gal = Galaktose
his = Histidin
leu = Leucin
try = Tryptophan
ace = Acetat
gly = Glycin
ala = Alanin
tyr = Tyrosin
lys = Lysin

cys = Cystein

thr = Threonin

met = Methionin

pho = alkalische Phosphatase

Literaturverzeichnis

- Alpers, D.H. und G.M. Tomkins, 1965: The order of induction and deinduction of the enzymes of the lactose operon in E.coli. Proc.Nat.Acad.Sc., 53, 797-803.
- Alpers, D.H. und G.M. Tomkins, 1966: Sequential transcription of the genes of the lactose operon and its regulation by protein synthesis. J.B.C., 241, 4434.
- Ames, B.N., P.E. Hartman und F. Jacob, 1963: Chromosomal alterations affecting the regulation of histidine biosynthetic enzymes in Salmonella. J.Mol.Biol., 7, 23-42.
- Apirion, D., 1966: Altered ribosomes in a suppressor strain of E.coli. J.Mol.Biol., 16, 285-301.
- Attardi, G., S. Naono, I. Rouviere, F. Jacob und F. Gros, 1963: Production of m-RNA and regulation of protein-synthesis. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 363-372.
- Beckwith, J.R., 1963: Restoration of operon activity by suppressors. BBA, 76, 162-164.
- Beckwith, J.R., 1964 a: Restoration of operon activity by suppressors. S.119-124. Erwin-Baur-Gedächtnisvorlesung III 1963, Akademie-Verlag Berlin.
- Beckwith, J.R., 1964 b: A deletion analysis of the lac-operator region in E.coli. J.Mol.Biol., 8, 427-430.
- Beisenherz, G., H.J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt und G. Pfeleiderer, 1953: Diphosphofructose - Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z.Naturforschg., 8b, 555-577.
- Benzer, S. und S.P. Champe, 1961: Ambivalent rII mutants of phage T4. Proc.Nat.Acad.Sc., 47, 1025-1038.
- Bode, W., 1963: Zur Natur der ausgedehnten Mutation des Coliphagen T4. Z.Vererbungsl., 94, 190-199.

- Bonhoeffer, F., 1966: DNA transfer and DNA-synthesis during bacterial conjugations. *Z.Vererbungsl.*, 98, 141.
- Bollen, A. und Herzog, 1966: A change in the protein complement of 30S ribosomes associated with an amber suppressor mutation. *Fed.Europ.Biochem.Soc.Abstracts*, 3rd Meeting Warsaw, S.30.
- Brenner, S. und J.R. Beckwith, 1965 a; Ochre mutants - A new class of suppressible nonsense mutants. *J.Mol.Biol.*, 13, 629-637.
- Brenner, S., A.O.W. Stretton und S. Kaplan, 1965 b: Genetic code: The nonsense triplets for chain termination and their suppression. *Nature*, 206, 994-998.
- Brenner, S., S. Kaplan und A.O.W. Stretton, 1966: Identity of N₂ and ochre nonsense mutants. *J.Mol.Biol.*, 19, 574-575.
- Brody, S. und C. Yanofsky, 1965: Mechanism studies of suppressor-gene-action. *J.Bacteriol.*, 90, 687-695.
- Capeocchi, M.R. und G.N. Gussin, 1965: Suppression in vitro: Identification of a serin-S-RNA as a "nonsense" suppressor. *Science*, 149, 417-422.
- Carbon, J., P. Berg und C. Yanofsky, 1966: Missense suppression due to a genetically altered t-RNS. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 31, 487-497.
- Contesse, G., S. Naono und F. Gros, 1966: Effect des mutations polaires sur la transcription de l'operon lactose chez E.coli. *C.R.Acad.Sc.Paris*, 263, 1007-1010.
- Crick, F.H., C.L. Barnett, S. Brenner und R.J. Watts-Tobin, 1961: General nature of the genetic codes for protein. *Nature*, 192, 1227-1232.
- Dennert, G., R. Hertel, G. Deppe und U. Henning, 1965: Action of an amber suppressor carried by phage ø80. *Z.Vererbungsl.*, 97, 243-254.

- Echols, H., A. Garen, S. Garen und A. Torriani, 1961: Genetic control of repression of alkaline phosphatase in *E.coli*, *J.Mol.Biol.*, 3, 425-438.
- Eidlic, L. und F.C. Neidhardt, 1965: Role of valyl-s-RNA synthetase in enzyme repression. *Proc.Nat.Acad.Sc.*, 53, 539-543.
- Englesberg, E., J. Irr, J. Power und N. Lee, 1965: Positive control of enzyme synthesis by gene C in the L-arabinose system. *J.Bacteriol.*, 90, 946-957.
- Epstein, R.H., A. Bolle, C.M. Steinberg, E. Kellenberger, E. Boy de la Tour, R. Chevalley, R.S. Edgar, M. Susman, G.H. Denhardt und A. Lielausir, 1963: Physiological studies of conditional lethal mutations of bacteriophage T4D. *Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.*, 28, 375-392.
- Franklin, N.C., W.F. Dove und C. Yanofsky, 1965: The linear insertion of a prophage into the chromosome of *E.coli* shown by deletion mapping. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 18, 910-923.
- Garen, A. und O. Siddiqi, 1961: Suppression of mutations in the alkaline-phosphatase structural cistron of *E.coli*. *Proc.Nat.Acad.Sc.*, 48, 1121-1127.
- Garen, A., S. Garen und R.C. Wilhelm, 1965: Suppressor genes for nonsense mutations. I. The su-1, su-2 and su-3 genes of *E.coli*. *J.Mol.Biol.*, 14, 167-178.
- Goldberger, R. und M.A. Berberich, 1965: Sequential repression and derepression of the enzymes for histidin biosynthesis in *Salm. typhimurium.*, *Proc.Nat.Acad.Sc.*, 54, 279-286.
- Guest, J.R. und C. Yanofsky, 1966: Relative orientation of gene, messenger and polypeptide chain. *Nature*, 210, 799-802.
- Gunsalus, J.C., 1954: Group transfer and acyl-generating functions of lipoic acid derivatives. S.545-580 in W.D. McElroy und B. Glass. *A Symposium on the mechanism of enzyme action*. Johns Hopkins Press, Baltimore.

- Hansen, R.G., 1966: Regulation of the pyruvate dehydrogenase activity in *Escherichia coli* K12. *BBA*, 122, 355-358.
- Henning, U. und C. Herz, 1964 a: Ein Strukturkomplex für den Pyruvatdehydrogenase-Komplex von *E.coli* K12. *Z.Vererbungs1.*, 95, 260-275.
- Henning, U., C. Herz und K. Szolyvay, 1964 b: Polarisation und Disproportionalität der Synthese von Enzymkomponenten des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes in *E.coli* K12. *Z.Vererbungs1.*, 95, 236-259.
- Henning, U., K. Szolyvay und C. Herz, 1964 c: Der Einfluß von Suppressorgenmutation und intragenischer Reversion auf Mutationsorte vom O^0 -Typ. *Z.Vererbungs1.*, 95, 276-287.
- Henning, U., G. Dennert, K. Szolyvay und G. Deppe, 1965 a: Mutationsorte vom O^0 -Typ in einem Strukturgen. *Z.Vererbungs1.*, 97, 1-9.
- Henning, U., G. Dennert, K. Szolyvay und G. Deppe, 1965 b: Amber mutants in the pyruvate dehydrogenase system of *E.coli* K12. *J.Mol.Biol.*, 13, 592-595.
- Henning, U., G. Dennert, R. Hertel und W.S. Shipp, 1966: Translation of the structural genes of the *E.coli* pyruvate dehydrogenase complex. Cold Spring Harbor Symp.Quant. Biol., 31, 227-234.
- Hill, R. und G.S. Stent, 1965: Genetic factors of *E.coli* determining suppression of the amber mutant phenotype of T4 bacteriophage. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 18, 757-762.
- Hirsch-Kauffmann, M., 1966: Promotionsarbeit, Universität Köln.
- Holley, R.W., J. Apgar, G.A. Everett, J.T. Madison, M. Marquisee, S.H. Merrill, J.R. Penswick und A. Zamir, 1965: Structure of a ribonucleic acid. *Science*, 147, 1462-1465.
- Imamoto, F., J. Ito und C. Yanofsky, 1966: Polarity in the

- tryptophan operon of E.coli. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 235-249.
- Jacob, F. und J. Monod, 1961: On the regulation of gene activity. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 193-211.
- Jacob, F. und J. Monod, 1965: Genetic mapping of the elements of the lactose region in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Comm., 18, 693-701.
- Kaplan, S., A.O.W. Stretton und S. Brenner, 1965: Amber suppressor: Efficiency of chain propagation and suppressor specific amino acids. J. Mol. Biol., 14, 528-533.
- Katze, J., S. Sidhana und I. Zabin, 1966: An amino-terminal peptide of β -galaktosidase. J.B.C., 241, 5341.
- Koike, M., L.J. Reed und W.R. Carroll, 1960: α -keto acid dehydrogenase complexes. I. Purification and properties of pyruvate and α -ketoglutarate dehydrogenase complexes of Escherichia coli. J.B.C., 235, 1924-1930.
- Koike, M., L.J. Reed und W.R. Carroll, 1963: α -keto acid dehydrogenase complexes IV. Resolution and reconstitution of the Escherichia coli pyruvate dehydrogenase complex. J.B.C., 238, 30-39.
- Korkes, S., A. Del Campillo, I.C. Gunsalus und S. Ochoa, 1951: Enzymatic synthesis of citric acid. IV. Pyruvate as acetyl-donor. J.B.C., 193, 721-735.
- Lennox, E.S., 1955: Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. Virology, 1, 190-206.
- Lynen, F., 1964: Coordination of metabolic processes, S.132-146 in M.Sela (ed.) New perspectives in biology. BBA Library, Vol.4, Elsevier Publishing Comp. Amsterdam.
- Malamy, M.H. und B.L. Horecker, 1964: Purification and crystallization of the alkaline phosphatase of Escherichia coli. Biochem., 3, 1893-1897.

- Maling, B.D. und C. Yanofsky, 1961: The properties of altered proteins from mutants bearing one or two lesions in the same gene. *Proc.Nat.Acad.Sc.*, 47/1, 551-566.
- Martin, R.G., D.F. Silbert, D.W.E. Smith und H.J. Whithield, 1966: Polarity in the histidine operon. *J.Mol.Biol.*, 21, 357-369.
- Massey, V., T. Hofmann und G. Palmer, 1962: The relation of function and structure in lipoyl dehydrogenase. *J.B.C.*, 237, 3820-3828.
- Matsushiro, A., 1963: Specialized transduction of tryptophan markers in *E.coli* K12 by bacteriophage ϕ 80. *Virology*, 19, 475-482.
- Newton, W.A., J.R. Beckwith, D. Zipser und S. Brenner, 1965: Nonsense mutants and polarity in the lac operon of *E.coli*. *J.Mol.Biol.*, 14, 290-296.
- Newton, W.A., 1966: Effect of nonsense mutation translation of the lactose operon of *E.coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 31, 181-187.
- Ouchterlony, O., 1958: Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, 5, 1-78.
- Peterkofsky, A., 1964: A role for methylated bases in the amino acid acceptor function of soluble ribonucleic acid. *Proc.Nat.Acad.Sc.*, 52, 1233-1238.
- Reed, L.J., F.R. Leach und M. Koike, 1958: Studies on a lipolic acid activating system. *J.B.C.*, 232, 123-142.
- Reed, L.J. und D.H. Cox, 1966: Macromolecular organisation of enzyme systems. *Ann.Rev.Biochem.*, in press.
- Reid, P.J., E. Orias und T.K. Gartner, 1965: Ribosomal protein differences in a strain of *E.coli* carrying a suppressor of an ochre-mutation. *Biochem.Biophys.Res. Comm.*, 21, 66-71.
- Rothman, F. und R. Byrne, 1963: Fingerprint analysis of alkaline phosphatase of *Escherichia coli* K12. *J.Mol.Biol.*, 6, 330-340.

- Signer, E.R., 1964: Recombination between λ and ϕ 80. *Virology*, 22, 650-651.
- Signer, E.R., J.R. Beckwith und S. Brenner, 1965: Mapping of suppressor loci in E.coli. *J.Mol.Biol.*, 14, 153-166.
- Signer, E.R., 1966: Interaction of prophages at the att80 site with the chromosome of E.coli. *J.Mol.Biol.*, 15, 243-255.
- Smith, J.D., N.N. Abelson, B.F.C. Clark, H.M. Goodman und S. Brenner, 1966: Amber suppressor s-RNA, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 479-488.
- Stent, G.S., 1964: The Operon: On its third anniversary. *Science*, 144, 816-820.
- Stretton, A.O.W. und S. Brenner, 1965: Molecular consequences of the amber mutation and its suppression. *J.Mol.Biol.*, 12, 456-465.
- Tomizawa, J. und T. Ogawa, 1967: Effect of ultraviolet irradiation on bacteriophage λ -immunity. *J.Mol.Biol.*, 23, 247-263.
- Vogel, H.J. und D.M. Bonner, 1956: A convenient growth medium for E.coli and some other microorganisms. *Microbial Genet. Bull.*, 13, 43-44.
- Weigert, M.G. und A. Garen, 1965 a: Base composition of nonsense codons in E.coli. *Nature*, 206, 992-994.
- Weigert, M.G., E. Lanka und A. Garen, 1965 b: Amino acid substitutions resulting from suppression of nonsense mutations II. Glutamine insertion by su2 gene, tyrosine insertion by the su3 gene. *J.Mol.Biol.*, 14, 522-527.
- Weigert, M.G. und A. Garen, 1965 c: Amino acid substitutions resulting from suppression of nonsense-mutations. *J.Mol. Biol.*, 12, 448-455.
- Weigert, M.G., E. Lanka und A. Garen, 1967 a: Base composition of nonsense codons in Escherichia coli II. The N2 codon UAA. *J.Mol.Biol.*, 23, 391-400.

- Weigert, M.G., E. Lanka und A. Garen, 1967 b: Amino acid substitutions resulting from suppression of nonsense mutations III. Tyrosine insertion by the su4 gene. J.Mol.Biol., 23, 401-404.
- Willson, C., D. Perrin, M. Cohn, F. Jacob, J. Monod, 1964: Non inducible mutants of the regulator gene in the "lactose" system of E.coli. J.Mol.Biol., 8, 582-592.
- Wittmann- Liebold, B. und H.G. Wittmann, 1964: Die primäre Proteinstruktur von Stämmen des Tabakmosaikvirus. Hoppe Seyler's Zeitschr. f. phys. Chem., 335, 69-116.
- Yanofsky, C. und E.S. Lennox, 1959: Transduction and recombination study of linkage relationship among the genes controlling tryptophan synthesis in Escherichia coli. Virology, 8, 425-447.
- Yanofsky, C., 1963: Amino acid replacements associated with mutation and recombination in the A-gene and their relationship to in vitro coding data. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 581-595.
- Yanofsky, C. und J. Ito, 1966: Nonsense codons and polarity in the tryptophane-operon. J.Mol.Biol., 21, 313-334.
- Yanofsky, C. und J. Ito, 1967: Orientation of antipolarity in the tryptophane-operon of E.coli. J.Mol.Biol., 24, 143-145.
- Zachau, H.G., D. Dütting, H. Feldmann, F. Melchers und W. Karau, 1966: Serine specific transfer ribonucleic acids XIV comparison of nucleotide sequence and secondary structure models. Cold Spring Harbor Quant. Biol., 31, 417-424.

Dank

Herrn Dr. U. Henning danke ich für das stets anregende Interesse und die vielseitige Unterstützung, die er mir bei der Anfertigung dieser Arbeit entgegengebracht hat.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Gewährung eines Stipendiums. Frl. G. Deppe und Frl. K. Szolyvay möchte ich für wertvolle Hilfe bei einigen P1-Transduktionen und den Acetylphosphatresten danken. Herrn Dr. R. Hertel danke ich für viele anregende Diskussionen. Die Gewinnung der Stämme Ac32 suiD^{-14} und Ac32 suiD^{-21} sowie die $\phi 80$ -T4- und die Ac32 suiD^{-14} - Ac32 suiD^{-21} - $\phi 80$ -Infektionsexperimente wurden in Zusammenarbeit mit ihm ausgeführt. Frl. G. Stock danke ich für die Anfertigung der Zeichnungen und der Schreibarbeiten.

Lebenslauf

Am 7. Oktober 1939 wurde ich als erster Sohn des Dr. Wolfgang Dennert und seiner Ehefrau Kläre, geborene Stier in Hettstedt-Südharz geboren. Nach der Flucht vor den Russen nach Bad Godesberg im Jahre 1945 besuchte ich dort vier Jahre die Grundschule und dann das naturwissenschaftliche Gymnasium Otto-Kühne-Schule, an der ich am 22. Februar 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Mein Studium der Biologie begann ich im Sommersemester 1960 in Bonn, unterbrochen durch ein Sommersemester an der Universität München.

Nach Absolvierung der botanischen, zoologischen und chemischen Großpraktika studiere ich seit dem Sommersemester 1964 an der Universität Köln.

Von Mai bis Juli 1964 absolvierte ich am Institut für Biochemie an der Universität Köln ein enzymchemisches Praktikum. Im Dezember 1964 begann ich meine Tätigkeit im Institut für Genetik als wissenschaftliche Hilfskraft und fertigte unter Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. U. Henning die vorliegende Arbeit an.

Tübingen, den 5. Juni 1967

Wolfgang Dennert

